

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Д.Ю. Шаравин, 2014

УДК 579.841.9:574.266

Д.Ю. Шаравин

РАЗНООБРАЗИЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ В ФИЛЬТРАЦИОННЫХ ВОДАХ ПОЛИГОНА ЗАХОРОНЕНИЯ ТВЁРДЫХ БЫТОВЫХ ОТХОДОВ

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Цель. Изучение видового разнообразия культивируемых протеобактерий (метилотрофных и нитратвосстанавливающих) в фильтрационных водах полигона твёрдых бытовых отходов (ПТБО).

Материалы и методы. Проведены гидрохимические и микробиологические анализы проб воды обводного канала ПТБО. Выделено 17 культур α -, β - и γ -протеобактерий, обладающих различными типами обмена веществ. Определено их филогенетическое положение и хемотаксономическая характеристика.

Результаты. 15 изолятов имели высокий уровень сходства с известными видами протеобактерий, включая 8 штаммов метилобактерий. Два метилотрофных изолята отнесены к неклассифицированным представителям класса *Betaproteobacteria* порядка *Methylophilales*.

Заключение. В фильтрационных водах ПТБО широко распространены культивируемые протеобактерии, включая аэробные нитратвосстанавливающие *Alphaproteobacteria*, метанотрофные и типично гетеротрофные *Gammaproteobacteria*, метилотрофные *Betaproteobacteria*.

Ключевые слова: Сточные воды, *Proteobacteria*, метилобактерии, нитратредукция, филогения.

D.Y. Sharavin

DIVERSITY OF CULTIVATED PROTEOBACTERIA IN A MUNICIPAL LANDFILL IRRIGATION CANAL

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, UrB RAS, Perm, Russia

Objective. The present study was aimed at investigation of diversity of cultivated nitrate-reducing, denitrifying and methylotrophic proteobacteria from the leachate of the municipal landfill irrigation canal.

Materials and methods. Hydrochemical and microbiological analyses of water probes from the landfill irrigation canal were done. 17 strains of α -, β -, and γ -proteobacteria with a different types of metabolism were isolated and identified using their phylogeny and chemotaxonomy.

Results. 15 isolates possessed significant similarity to known species including 8 strains of methylotrophs. Two methylotrophic strains were assigned to the unknown *Betaproteobacteria* representatives of the order *Methylophilales*.

Conclusions. Cultivated proteobacteria, including aerobic nitrate-reducing *Alphaproteobacteria*, methanotrophs, heterotrophic *Gammaproteobacteria* and methylotrophic *Betaproteobacteria* are dominate among the bacteria in a landfill leachate.

Key words: Leachate, *Proteobacteria*, methylobacteria, nitrate reduction, phylogeny.

Введение

Основную часть твердых бытовых отходов (ТБО) городов подвергают захоронению на специально оборудованных площадках/полигонах (ПТБО). Органические компоненты залежей ТБО разлагаются микроорганизмами с образованием биогаза, состоящего примерно на 50-70% из CH_4 и на 30-50% из CO_2 . ПТБО являются важным источником атмосферного метана, их вклад в глобальную эмиссию этого парникового газа оценивается в 6-12%. В теплый период года в покрывающем аэробном слое почвы увеличивается общая численность метанотрофов, к осени интенсивность окисления метана достигает максимума и эмиссия CH_4 в атмосферу существенно сокращается [1-4]. Кроме эмиссии метана ПТБО оказывают негативное воздействие на окружающую среду даже после их закрытия, в частности из-за продолжающегося стока загрязненных фильтрационных и инфильтрационных вод. Однако многие вопросы экологии и функциональной роли водных микроорганизмов в сточных водах ПТБО остаются неизученными.

В фильтрационных водах ПТБО, загрязнённых соединениями азота, фосфора и металлов, обнаружено массовое распространение культивируемых протеобактерий, включая малоизученные на других полигонах ТБО метилотрофные и нитратвосстанавливающие протеобактерии. У микробиоценоза слабощелочных придонных вод обводного канала ПТБО выявлена высокая потенциальная способность к денитрификации.

Настоящая работа посвящена изучению видового разнообразия культивируемых метилотрофных и нитратвосстанавливающих протеобактерий в фильтрационных водах ПТБО г. Перми.

Материалы и методы

В 2010-2012 гг. изучали микробиоценоз водных масс обводного канала ПТБО “Софроны” г. Перми, используемого для утилизации основной массы городского мусора с 1978 г.

Численность аэробных и анаэробных бактерий в фильтрационных водах ПТБО определяли методом предельных разведений на жидких и агаризованных средах, используемых при изучении отдельных групп пресноводных микроорганизмов, участвующих в превращениях соединений углерода и азота [5-7]. Посевы инкубировали при 25-30°C в течение 2-14 суток до появления отдельных колоний на плотных средах или клеточных суспензий на жидких средах. Методом предельных разведений выделено 17 нейтрофильных

изолятов нитратвосстанавливающих протеобактерий, включая 8 штаммов аэробных метиловых бактерий.

Для культивирования метиловых бактерий использовали модифицированную нами среду «К» [7] при 28°C и pH 7.2 (г/л): NaCl – 2; KН₂PO₄ – 1; MgSO₄ · 7H₂O – 0.5; NaHCO₃ – 0.4; FeSO₄ · 7H₂O – 0.002; (NH₄)₂SO₄ – 0.3; KNO₃ – 0.6; дрожжевой экстракт – 0.05; витамин В₁₂ – 20 мкг/л; метанол – 5 мл/л; микроэлементы по Пфеннигу – 1 мл/л. Для получения плотных сред того же состава добавляли 20 г/л агара Difco. Культуры хранили на скошенном агаре при 2-3°C в пробирках под резиновыми пробками. При анаэробном культивировании протеобактерий в качестве акцепторов электронов использовали нитрат калия (2 г/л), тестируя в качестве донора электронов метанол, ацетат, цитрат, глюкозу, пептон и пируват. Для выявления сапротрофных компонентов из накопительных культур метилотрофных β-протеобактерий использовали метод последовательных пересевов отдельных колоний на плотной среде (г/л): агар Difco – 20; NaCl – 2; KН₂PO₄ – 1; MgSO₄ · 7H₂O – 0.5; пептон – 5.

Гидрохимические анализы выполняли согласно практическому руководству по изучению состава промышленных сточных вод [8]. Содержание металлов в фильтрационных водах ПТБО определяли после подкисления проб азотной кислотой до pH < 2 на атомно-абсорбционном спектрометре Shimadzu AA-6300 (Япония).

Способность к денитрификации микрофлоры сточных вод и культур протеобактерий оценивали по накоплению N₂O в газовой фазе с N₂ и ацетиленом. О способности культур к фиксации молекулярного азота судили по нитрогеназной активности восстановления ацетилена в этилен в микроаэробных условиях. Анализ газовых смесей производили на хроматографе Chrom-5 (Чехословакия) с применением катарометра, колонки длиной 2.4 м и диаметром 6 мм с абсорбентом Porapak N (США). Жирнокислотный состав (ЖК) анализировали на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890/5973N (США). ЖК концентрированной центрифугированием бактериальной биомассы переводили в метилированные эфиры в смеси метанол–HCl, эфиры экстрагировали гексаном, затем разделяли на хроматографической капиллярной колонке с неполярной фазой HP-5MS в режиме программирования температуры и далее анализировали в динамическом режиме на масс-спектрометре [9]. Идентификацию метиловых эфиров ЖК осуществляли с использованием автоматизированной системы обработки масс-

спектральных данных AMDIS с поиском целевых компонентов по библиотеке NISTEPА, MSL (США) с фактором сходства не менее 80%.

На первом этапе выделения микроорганизмов, доминирующих в фильтрационных водах ПТБО, в суспензиях и колониях которых визуально загрязнений не обнаруживали, секвенировали нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК. Затем проводили первичный сравнительный анализ полученных последовательностей с помощью программного пакета BLAST [10]. На заключительном этапе выделения чистых культур протеобактерий, в частности, у метилотрофных штаммов определяли практически полные последовательности гена 16S рРНК (1475-1505) нуклеотидов. Затем эти последовательности анализировали с помощью пакета программ Classifier [11]. Филогенетический анализ проводили по методу maximum-likelihood и алгоритмов, реализованных в пакете программ TREE-CON и MEGA 4 [12]. Последовательности генов 16S рРНК, полученные в данной работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами KC577607– KC577612.

Результаты и обсуждение

Исследованные фильтрационные воды обводного канала ПТБО характеризовались “высоким загрязнением” по химическому потреблению кислорода (ХПК), общей численности бактерий и одноклеточных водорослей, “кишечных палочек”, аммоний, нитратам, нитритам, фосфору, меди, железу и никелю (табл. 1).

Общая численность бактериоподобных клеток по методу прямого счета (N_6) в придонных водах мелководного обводного канала ПТБО (700-1640 млн. кл/мл) оказалась в среднем в 90 раз выше, чем в поверхностных слоях воды (6-20 млн. кл/мл). Повышение численности N_6 обычно происходило весной в пробах надильной воды, содержащих много растворенного метана (1,6 – 2,2 мл CH_4 /л), черной взвеси и анаэробных сульфатвосстанавливающих бактерий (СВБ). В то же время численность СВБ в воде у поверхности была в среднем в 5000 раз ниже (0,01% от N_6), чем у дна (15-22% от N_6). При этом массовое распространение СВБ было обусловлено преимущественным развитием анаэробных грамотрицательных *Deltaproteobacteria*, по морфотипу сходных с *Desulfovibrio desulfuricans* и *D. vulgaris*.

В сообществе микроорганизмов фильтрационных вод ПТБО были широко представлены условно патогенные *Gammaproteobacteria*, выявляемые на

лактозо-пептонном агаре Макконки с солями желчи и кристаллвиолета.

Таблица 1. Гидрохимическая и микробиологическая характеристика поверхностных и придонных вод обводного канала пермского ПТБО «Софроны» в 2010 – 2012 гг.

Показатель	Вода у поверхности	Вода придонная
рН	8.3±0.3	8.0±0.3
Химическое потребление кислорода, мг О/л	320±128	353±93
Численность водорослей, млн. кл/мл	0.57±0.32	1.55±1.42
Численность бактерий (N ₆), млн. кл/мл	13±7	1170±470
Протеобактерии, % от N ₆ :		
Сульфатовосстанавливающие анаэробы	0.01±0.01	12±10
Аэробные метиловобактерии	32±28	0.5±0.2
Нитритокисляющие	0.15±0.05	0.03±0.01
Аммонийокисляющие	0.02±0.01	0.004±0.002
Энтеробактерии на агаре Макконки	0.11±0.10	0.006±0.0005
Содержание метана, мл СН ₄ /л	0.23±0.18	1.51±0.66
Содержание минеральных веществ, мг/л:		
Фосфор общий	0.35±0.08	2.5±0.6
Аммоний	39.2±18.3	48.7±17.7
Нитраты	47.6±14.6	45.1±15.3
Нитриты	1.9±0.5	2.2±1.1
Хлориды	985±262	990±274
Гидрокарбонаты	803±120	842±105
Сульфаты	617±248	623±243
Натрий	582±224	645±266
Калий	266±85	335±22
Магний	182±27	152±18
Кальций	93±27	90±25
Железо	0.41±0.20	3.23±1.45
Никель	0.12±0.02	0.14±0.03
Медь	0.09±0.06	0.12±0.07
Цинк	0.04±0.01	0.12±0.06
Свинец	0.07±0.02	0.07±0.01
Хром	0.02±0.01	0.02±0.01
Кадмий	0.004±0.001	0.005±0.001

При этом на данной селективной среде высевались, преимущественно, лактоза-ферментирующие палочки рода *Enterobacter*, в частности, *E. asburiae* с Г+Ц в ДНК 56.0 мол.% и основными ЖК С_{16:1}, С₁₆, С_{18:1}. Они быстро росли

на глюкозо-пептонном агаре, в качестве единственного источника углерода и энергии использовали различные углеводы, цитрат и пируват, восстанавливали нитраты до нитритов.

Практически все 17 чистых культур аэробных протеобактерий, выделенных из образцов сточных вод ПТБО, обладали способностью к нитратредукции. При этом изоляты *Alphaproteobacteria* (включая типично гетеротрофные, метилотрофные и метанотрофные) относились к родам лишь одного порядка *Rhizobiales*: *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium* и *Methylosinus*. В их жирнокислотных профилях явно преобладала октадеценовая C_{18:1} кислота (60-85% в сумме ЖК). В частности, штамм RS-V2 представлял собой розово-пигментированную факультативную метиловую бактерию, способную к денитрификации на метаноле и, особенно, на пирувате. Подвижные палочки размером 0,8–1,4×1,0–3,0 мкм со слабо выраженной каталазной и оксидазной активностью. Содержание Г+Ц в ДНК составляло 70,5 мол.%. Согласно результатам филогенетического анализа последовательностей генов 16S рРНК, изолят имел высокий уровень сходства (99,3%) с *Methylobacterium radiotolerans* и, следовательно, являлся штаммом указанного вида: *Mb. radiotolerans* RS-V2 (рис. 1).

У штаммов альфапротеобактерий - RS-X6 (по последовательностям нуклеотидов в гене 16S рРНК) на 97,7% сходен с *Ochrobactrum cytisi* и RS-Mo1 (*Methylosinus trichosporium*), у гаммапротеобактерий – RS-B, RS-H (на 98,1-98,8% сходны с *Shewanella putrefaciens*) и RS-X5 (97,8% – со *Stenotrophomonas maltophilia*) выявлена способность к фиксации молекулярного азота: рост на безазотистой среде и нитрогеназная активность по восстановлению ацетилена до этилена.

В исследованных образцах воды численность культивируемых на селективных средах хемолитоавтотрофных аммоний- и нитритокисляющих протеобактерий, метанотрофов – на среде “П” под газовой фазой с 15% CH₄ при 25°C, была значительно ниже численности метиловых бактерий на плотной и жидкой среде “К” с 5 мл/л метанола: от 4 до 60% от N₆ в поверхностных пробах и 0,3-0,7% от N₆ в придонной воде (табл. 1).

Среди культивируемых метанотрофов доминировали альфапротеобактерии рода *Methylosinus* (*M. trichosporium*) и гаммапротеобактерии рода *Methylomonas* (*M. methanica*), среди метиловых бактерий – бетапротеобактерии рода *Methyloversatilis* порядка *Rhodocyclales* (сходство штаммов RS-XM, RS-X1,

RS-X2 с *Methyloversatilis universalis* составило 99,4–99,7%) и двух таксономически неопределённых штаммов (RS-X3, RS-M7) порядка *Methylophilales* (рис.1).

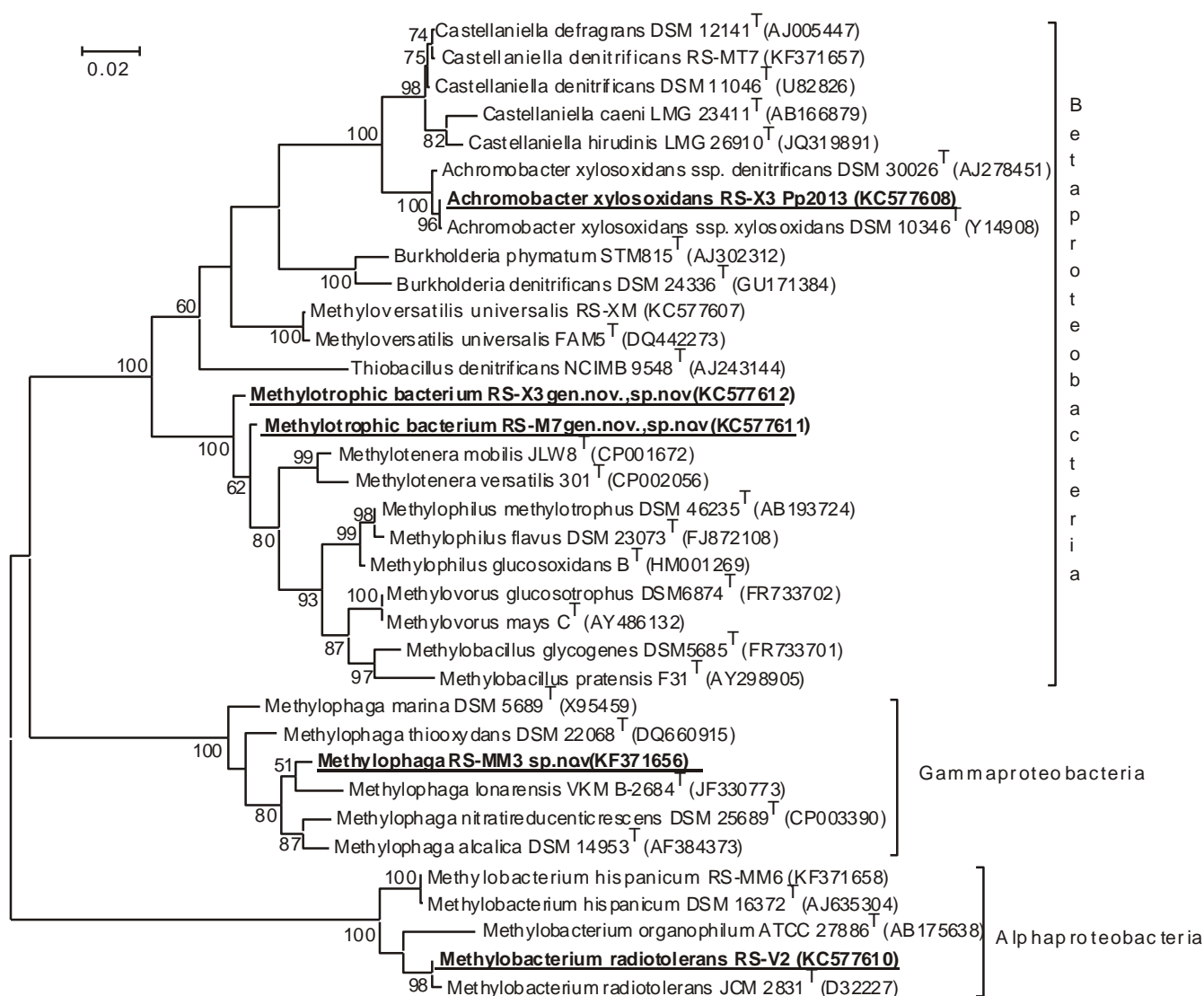


Рис. 1. Бескорневая дендрограмма филогенетических отношений последовательностей 16S рРНК (длиной 1249 п.н.) для изученных изолятов (по алгоритму maximum-likelihood). Значения «bootstrap» показаны для 1000 повторностей. Указана достоверность ветвления выше 50%. Масштаб: 2 нуклеотидные замены на 100 нуклеотидов. Типовые штаммы видов рода обозначены надстрочным Т. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным подчёркнутым шрифтом.

Филогенетически штамм RS-XM был наиболее близок к типовому виду *Methyloversatilis universalis* (99,7%) семейства *Rhodocyclaceae*, но удален от штаммов RS-X3, RS-M7 (90,8-91,0%) и от альфапротеобактерии *Methylobacterium radiotolerans* RS-V2 (78,6%). Два филогенетически близких изолята RS-X3, RS-M7 примыкали к группе родов семейства *Methylophilaceae*: *Methy-*

lotenera, *Methylovorus*, *Methylobacillus* и *Methylophilus* (93,6-95,1%). По результатам анализа последовательности генов 16S рРНК изоляты RS-X3, RS-M7 были отнесены к неклассифицированным представителям класса *Betaproteobacteria*.

У всех метилотрофных изолятов бетапротееобактерий в жирнокислотном профиле преобладали C₁₆, C_{16:1}, C_{18:1} (70-85% в сумме ЖК), содержание Г+Ц в ДНК составляло 58-68 мол.%. Все они являлись пресноводными нейтрофилами и мезофилами, росли на широком спектре органических субстратов, в анаэробных условиях в качестве терминальных акцепторов электронов использовали нитраты и нитриты.

Накопительные культуры изолятов RS-X3 и RS-M7 представляли собой ассоциации метилотрофных и сапротрофных β -протеобактерий. Из ассоциаций RS-X3 и RS-M7 были выделены чистые культуры *Betaproteobacteria* порядка *Burkholderiales* с высокой каталазной активностью: из RS-M7 – сапротрофный *Comamonas* sp. RS-M7Pp2013 (на 96,5% сходен с *Comamonas terrigena*), из RS-X3 – сапротрофный и метилотрофный *Achromobacter xylosoxidans* RS-X3Pp2013 (99,2% – с *Achromobacter xylosoxidans* ssp. *xylosoxidans*).

Methyloversatilis universalis FAM5^T порядка *Rhodocyclales* и изолят *M. universalis* RS-XM на построенной дендрограмме формировали периферический кластер, обособленный от кластера, включающего представителей четырех ранее описанных родов семейства *Methylophilaceae* и двух представляемых в данной работе уникальных метилотрофных изолятов RS-M7 и RS-X3. Уровни сходства последовательностей генов 16S рРНК между этими кластерами составляли 84,1–91,0%. Столь же значительно удалены (86,9%) партнеры по ассоциации в накопительных культурах (метилотрофный RS-M7 и сапротрофный RS-M7Pp2013). Изолят *Methyloversatilis universalis* RS-XM оказался несколько ближе к метилюобактерии *Burkholderia phymatum* STM815^T (92,2%).

Ряд культур изолятов α -, β - и γ -протеобактерий из образцов фильтрационных вод полигона “Софроны”, независимо от типа обмена веществ, обладали способностью к нитратредукции и интенсивной денитрификации на пирувате (табл. 2). На метаноле активность денитрификации оказалась в десятки раз слабее даже у метилюобактерий и отсутствовала у штаммов *Shewanella*

putrefaciens и *Ochrobactrum cytisi* RS-X6. На средах с метанолом или пируватом диссимиляционная нитратредукция до N_2O и N_2 не была обнаружена только у *Methylosinus trichosporium* RS-Mo1 и *Methylomonas methanica* RS-Mo2, несмотря на их способность использовать нитраты в качестве источника азота, а метан и метанол – в качестве источника углерода и энергии.

Таблица 2. Интенсивность денитрификации у культур α -, β - и γ - протеобактерий, изолированных из вод пермского ПТБО, на средах с пируватом и метанолом

Штамм	Организм	Денитрификация, мг N/л в сут	
		на метаноле	на пирувате
RS-V2	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	5.1	52
RS-XM	<i>Methyloversatilis universalis</i>	2.2	83
RS-M7, RS-X3	Неклассифицированные представители порядка <i>Methylophilales</i>	1.3-1.5	97-110
RS-X5	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	0.9	106
RS-B, RS-H	<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	91-128
RS-X6	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	0	121

Для определения активности денитрификации при благоприятных окислительно-восстановительных условиях в слабощелочной придонной воде из обводного канала ПТБО в пробы вносили органические вещества и минеральные соединения азота (табл. 3).

Таблица 3. Повышение интенсивности денитрификации под влиянием добавок органических и азотсодержащих веществ (при 24°C) в образцах придонной воды обводного канала пермского ПТБО

Добавка в 1 л пробы	Денитрификация, мкг N/л в сут	Содержание нитритов, мкг N/л
Контроль, вода без добавок	340±5	60±5
Метанол, 1 мл	380±10	15±5
Пируват Na, 0.5 г	450±15	0
NaNO ₃ , 5 мг N	1430±50	360±15
NaNO ₃ , 5 мг N + метанол, 1 мл	1480±35	480±25
NaNO ₃ , 5 мг N + пируват Na, 0.5 г	3840±40	250±10
NaNO ₂ , 5 мг N + пируват Na, 0.5 г	4850±80	460±35

Примечание. Пробы отобраны 4 октября 2012г. Температура природной воды составляла 2 °С, рН 7.9, содержание (мг N/л): нитриты – 0.3, нитраты – 7.8, аммоний –34.6.

После введения метанола и пирувата процесс денитрификации активировался слабо, преимущественно, за счет усиления потребления нитритов. Введение метанола совместно с нитратами (по сравнению с добавками одних

нитратов) существенно активировало только процесс накопления нитритов. Следует отметить, что добавление пирувата совместно с нитратами и, особенно с нитритами, резко усиливало интенсивность денитрификации. При этом азот добавленных нитритов (5 мг N-NO₂/л) уже через 1 сут. практически полностью переходил в N₂O (при ингибировании N₂O-редуктазы ацетиленом).

Заключение

В фильтрационных водах ПТБО г. Перми обнаружено “высокое загрязнение” соединениями азота, фосфора и тяжелыми металлами.

Эти условия способствовали преимущественному распространению культивируемых протеобактерий. Они включали анаэробные сульфатвосстанавливающие бактерии (СВБ) *Deltaproteobacteria*, аэробные нитратвосстанавливающие *Alphaproteobacteria* порядка *Rhizobiales*, метанотрофные и типично гетеротрофные *Gammaproteobacteria*, метилотрофные *Betaproteobacteria* порядка *Burkholderiales* (*Achromobacter xylosoxidans*), порядка *Rhodocyclales* (*Methyloversatilis universalis*) и два изолята (RS-X3, RS-M7) с таксономически неопределенным положением, примыкающих к группе родов семейства *Methylophilaceae*. Большинство изученных метилобактерий (*Methylobacterium radiotolerans* RS-V2, *Methyloversatilis universalis* RS-XM, RS-X1 и RS-X2, *Stenotrophomonas maltophila* RS-X5, изоляты RS-X3, RS-M7) в аэробных условиях росли на средах с метанолом, но в анаэробных условиях на средах с пируватом и нитратами росли как активные денитрификаторы. На метаноле активность денитрификации и анаэробный рост у них был значительно слабее. Также в придонных водах обводного канала ПТБО интенсивность потенциальной денитрификации осенью была исключительно высока при введении добавок пирувата совместно с нитратами и особенно с нитритами. Ранее неоднократно обращали внимание на прямую и опосредованную связь процессов денитрификации в определенных сточных водах и донных осадках с активностью сообществ метано- и метилотрофов [13-15]. Например, в донных отложениях мезотрофного озера Вашингтон (Сиэтл, США) среди денитрификаторов обнаружены аэробные метилобактерии семейства *Methylophilaceae*, особенно доминирующие там виды рода *Methylostenobacterium* [15].

(Работа выполнена при поддержке Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, проект № 01200963684 с использованием уникального научного оборудования АЦКП «Биоинженерия» (ФГБУН Центр «Биоинженерия» РАН).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ножевникова А.Н., Каллистова А.Ю., Кевбрина М.В. Эмиссия и окисление метана на полигоне захоронения твердых бытовых отходов: сезонные измерения. Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского. М.: Наука, 2006. 13: 172-191.
2. Vogner J.E., Spokas K.A. Landfill CH₄: rates, fates, and role in global carbon cycle Chemosphere. 1993. 26. (1/4): 369-386.
3. Вайсман Я.И., Вайсман О.Я., Максимов С.В. Управление метаногенезом на полигонах твердых бытовых отходов. - Пермь: ПГТУ, 2003. 232 с.
4. Каллистова А.Ю., Кевбрина М.В., Некрасова В.К. и др. Окисление метана в покрывающей почве полигона захоронения твердых бытовых отходов. Микробиология. 2005. 74(5): 699-706.
5. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 288с.
6. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500с.
7. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловобактерии. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 325с.
8. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: МГУ, 1975. 246с.
9. Саралов А.И., Кузнецов Б.Б., Реутских Е.М. и др. *Arhodomonas recens* sp.nov. – галофильная алканотрофная водородная бактерия из рассолов флотационного обогащения калийных минералов. Микробиология. 2012. 81.(5): 630-637.
10. Basic Local Alignment Search Tool [Электронный ресурс] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA. (Url: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
11. Classifier – Start [Электронный ресурс] Michigan State University, USA. (Url: <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)
12. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 2011. 28: 2731-2739.
13. Nercessian O., Noyes E., Kalyuzhnaya M.G. et al. Bacterial populations active in metabolism of C₁ compounds in the sediment of Lake Washington a freshwater lake. Appl. Environ. Microbiol. 2005. 71: 6885-6899
14. Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E., Chistoserdova L. Real-time detection of actively metabolizing microbes by redox sensing as applied to methylotroph populations in Lake Washington. ISME J. 2008. 2: 1029-1034.
15. Kalyuzhnaya M.G., Martens-Habbena W., Wang T. et al. Methylophilaceae link methanol oxidation to denitrification in freshwater lake sediment as suggested by stable isotope probing and pure culture analysis. Environ. Microbiol. Reports. 2009. 1(5): 385-392.

Поступила 25.07.2014

(Контактная информация: **Шаравин Дмитрий Юрьевич** - аспирант Лаборатории водной микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН; адрес: 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; тел. 89024772024; e-mail: dima-sharavin@yandex.ru)