

4  
НОМЕР



**ISSN 2304-9081**

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

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

**УЧРЕДИТЕЛИ**

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2016

УДК 57.088.2

*Е.А. Селиванова<sup>1</sup>, Ю.А. Хлопко<sup>1</sup>, Д.В. Пошвина<sup>1</sup>,  
Н.Е. Гоголева<sup>2</sup>, С.Д. Борисов<sup>3</sup>, А.О. Плотников<sup>1,3</sup>*

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ТОТАЛЬНОЙ ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ ЦИАНО-БАКТЕРИАЛЬНЫХ МАТОВ**

<sup>1</sup> Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

<sup>2</sup> Казанский институт биохимии и биофизики РАН, Казань, Россия

<sup>3</sup> Оренбургский государственный медицинский университет, Оренбург, Россия

*Цель.* Разработка оптимальной методики выделения тотальной ДНК из образцов циано-бактериальных матов.

*Материалы и методы.* Объектом исследования послужили образцы циано-бактериального мата с высокой концентрацией прокариот из устьевой части солоноватой реки Чернавка (природный парк Эльтонский, Волгоградская область). ДНК выделяли методом химического лизиса (основная методика), модификация методики заключалась в использовании лизоцима. Из полученной ДНК были приготовлены ДНК-библиотеки. 16S метагеномное секвенирование ДНК-библиотек проводилось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Данные по составу сообществ обрабатывались комплексом биоинформационных программ. Эффективность методики оценивали по количеству ридов и ОТЕ, а также качественному и количественному составу сообщества.

*Результаты.* Всего из образца циано-бактериального мата было выделено 158849 и 140463 ридов прокариот, с использованием основной методики выделения ДНК и методики с модификацией, соответственно. Таксономический состав прокариот в образцах был идентичным, вне зависимости от использованного метода, тогда как относительная численность микроорганизмов различных таксонов значительно отличалась.

*Заключение.* Для выделения ДНК из образцов циано-бактериальных матов предпочтительно использовать модификацию метода химического лизиса с дополнительной обработкой клеток лизоцимом или механической гомогенизацией для более полного разрушения клеточных стенок цианопрокариот.

*Ключевые слова:* экстракция ДНК, метагеномный анализ, циано-бактериальные маты, секвенирование следующего поколения, Illumina.

---

---

*Е.А. Selivanova<sup>1</sup>, Y.A. Khlopko<sup>1</sup>, D.V. Poshvina<sup>1</sup>,  
N.E. Gogoleva<sup>2</sup>, S.D. Borisov<sup>3</sup>, A.O. Plotnikov<sup>1,3</sup>*

## **COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF TOTAL DNA ISOLATION METHODS FROM THE SAMPLES OF CYANOBACTERIAL MATS**

<sup>1</sup> Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis UB RAS, Orenburg, Russia

<sup>2</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics RAS, Kazan, Russia

<sup>3</sup> Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

*Objective.* Development of the optimal method of the total DNA extraction from the samples of cyanobacterial mats.

*Materials and methods.* For the study samples of cyanobacterial mat with a high concentration of prokaryotes from the mouth of the brackish river Chernavka (Natural Park Eltonsky, Volgograd region) were taken. A total genomic DNA was extracted by chemical lysis (the main method). A modification of the method included an additional treatment with lysozyme. The

DNA libraries were prepared from the isolated DNA. 16S metagenomic sequencing of the DNA libraries was conducted in MiSeq (Illumina). Data analysis was carried out using a complex of bioinformatic programs. An efficiency of method was evaluated by the number of reads and OTUs, as well as by qualitative and quantitative composition of the community.

*Results.* In total, 158 849 and 140 463 prokaryotic reads were produced with the main method of DNA extraction and modified method, respectively. Taxonomic composition of prokaryotes in the samples was identical, regardless of the method used, while relative abundances of microbial taxa differed significantly.

*Conclusion.* For total DNA extraction from the samples of cyanobacterial mat the modified method of chemical lysis with additional lysozyme treatment or mechanical homogenization for complete destruction of the cyanoprokaryotes cell walls is preferable.

*Key words:* extraction of DNA, metagenome analysis, cyanobacterial mats, NGS, Illumina.

## **Введение**

Микробные маты являются структурно упорядоченными макроскопическими скоплениями микроорганизмов. Фотосинтетические маты являются удобным объектом для изучения комплексного микробного сообщества. Цианобактериальные маты развиваются в тех водных экосистемах, где стрессовое действие среды лимитирует или исключает выедание микроорганизмов и их конкуренцию за пространство; подобными местообитаниями являются гипергалинные озера и лагуны [1].

Современные методы высокопроизводительного секвенирования широко применяются для характеристики биоразнообразия микроорганизмов в различных местообитаниях и часто приводят к получению новых данных, меняющих представления о природных сообществах. Благодаря использованию NGS-технологий появилась возможность преодолеть ограничения, связанные с наличием некультивируемых микроорганизмов, и значительно расширить представления о природных микробных сообществах, в том числе экстремофильных. Однако для точного определения сложной структуры сообществ в природных образцах важно использовать адекватные методики экстракции тотальной ДНК, ее очистки и амплификации участков, кодирующих ген 16S рРНК, не искажающие качественный и количественный состав микроорганизмов в пробах. Выделение ДНК из природного образца является первым и ключевым этапом, от успешности проведения которого в большой степени зависит конечный результат метагеномного исследования [2]. В настоящее время продолжается активный поиск новых эффективных методик, позволяющих выделять чистую ДНК в высокой концентрации из различных природных объектов [3-6].

Учитывая наличие разнообразных методик и их модификаций при отсутствии универсального протокола, целью данного исследования стал подбор оптимального способа экстракции тотальной ДНК из образцов микробного мата устьевой части солоноватой р. Чернавка.

### **Материалы и методы**

Для разработки эффективной методики выделения ДНК были отобраны образцы циано-бактериальных матов с высокой концентрацией прокариот из устьевой части солоноватой реки Чернавка (природный парк Эльтонский, Волгоградская область) в августе 2014 г. ДНК выделяли методом химического лизиса по следующей методике (основная методика):

1. К 150 мг образца добавляли 500 мкл ТСБ буфера (1М Трис-НСl – 1 мл; 0,5М ЭДТА – 0,6 мл; 5М NaCl – 0,2 мл; pH – 8,0) и 50 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия;
2. Инкубировали 20 мин при 60°C;
3. Добавляли фенол-хлороформную смесь (1:1) 550 мкл, встряхивали 5 мин вручную;
4. Центрифугировали (комн. t, 14500 об/мин, 5 мин);
5. Отбирали водную фазу 450 мкл в новую пробирку;
6. Добавляли равный объём хлороформ-изоамилового спирта (24:1);
7. Встряхивали 5 мин. Центрифугировали (комн. t, 14500 об/мин, 5 мин);
8. Отбирали водную фазу 350 мкл в новую пробирку, добавляли 40 мкл 10М ацетата аммония и 1000 мкл ледяного абсолютного спирта (-20°C);
9. Для осаждения ДНК оставляли на ночь в морозилке (-20°C);
10. Центрифугировали (+4°C, 14000 об/мин, 30 мин);
11. Отбирали спирт, добавляли 400 мкл 70% этилового спирта (4°C);
12. пп. 10 и 11 повторяли, отбирали спирт, сушили осадок ДНК на воздухе
13. Растворяли осадок ДНК в 30 мкл MQ.

Модификация методики заключалась в использовании лизоцима, поскольку в некоторых случаях лизоцим считается необходимым для разрушения бактериальной клеточной стенки [7]. Модификация методики была следующей: на первом этапе к образцу добавляли 500 мкл ТСБ буфера и 100 мкл такого же буфера с лизоцимом (10 мг/мл), инкубировали 60 мин при 37°C, перемешивали на вортексе каждые 15 мин; потом добавляли 50 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия и инкубировали 20 мин при 60°C. Затем добавляли фенол-хлороформную смесь и выделяли ДНК далее в соответствии с

основной методикой.

Для исключения возможной контаминации использовали отрицательный контроль, в котором 100 мкл деионизированной автоклавированной воды обрабатывали с использованием описанной выше методики. Чистоту ДНК контролировали с помощью электрофореза в 1.5% агарозном геле. Концентрацию ДНК определяли с использованием Флюориметра Qubit 2.0 с китом Quanti Fluor dsDNA (Life Technologies). ДНК библиотеки для секвенирования были созданы по протоколу Illumina ([http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)) с праймерами к V3 и V4 регионам 16S рРНК для прокариот (прямой S-D-Bact-0341-b-S-17 и обратный S-D-Bact-0785-a-A-21) [8] и к V4 региону 18S рРНК для эукариот (прямой TAREuk454FWD1 и обратный TAREukRev3). Метагеномное секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН. Данные по составу сообществ обрабатывали комплексом биоинформационных программ USEARCH v8.0.1623\_win32 [9], включая слияние парных ридов, фильтрацию по качеству ридов и отбор по длине ампликонов (минимальный размер - 300 bp). Таксономическая классификация последовательностей проводилась с использованием базы данных VAMPS [10].

Эффективность методики оценивали по количеству ридов и ОТЕ, оставшихся в результате биоинформационной обработки данных секвенирования, а также путем сравнения качественного и количественного состава сообщества.

### **Результаты и обсуждение**

Всего из образца циано-бактериального мата с использованием основной методики выделения ДНК и методики с модификацией было выделено 158849 и 140463 ридов прокариот, соответственно, объединившихся в 916 ОТЕ (операционные таксономические единицы) в обоих случаях. После удаления сингл- и даблтонов количество ОТЕ сократилось до 456 и 407, соответственно.

Количество ридов и ОТЕ, полученных в результате секвенирования и на разных этапах биоинформатической обработки, представлено в таблице 1.

Таблица 1. Оценка результатов секвенирования образцов ДНК, выделенной различными методами

	Основная методика	Методика с модификацией
Начальное количество ридов	158849	140463
Количество ридов после фильтрации	27275	30034
Количество ОТЕ	916	916
Количество ОТЕ после удаления загрязняющих ридов	897	897
Количество ОТЕ после удаления синглтонов и даблтонов	456	407

При анализе кривых насыщения ОТЕ в образцах в зависимости от метода выделения ДНК отмечено, что кривые имели сходный вид. В обоих случаях насыщение, то есть полное определение всех видов в сообществе, достигнуто не было, однако изученность видового состава оказалась выше при использовании основного метода за счет большего количества ОТЕ.

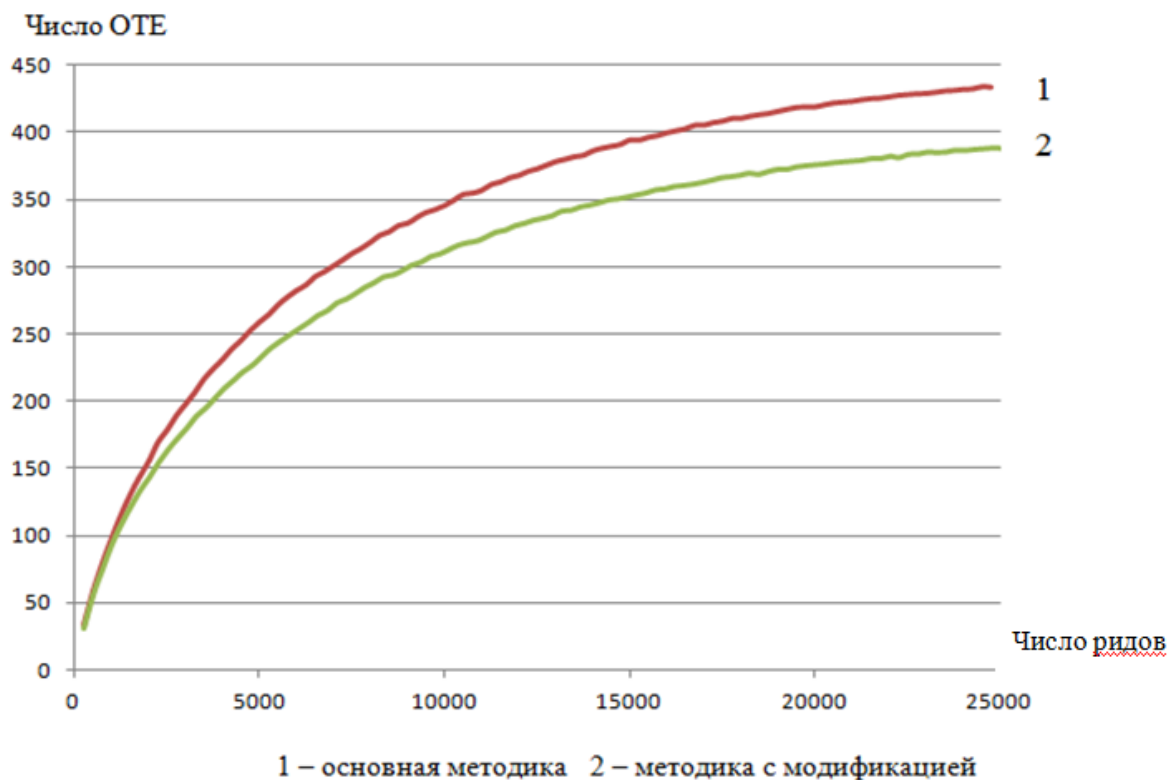


Рис. 1. Кривые насыщения количества ОТЕ в образцах в зависимости от метода выделения ДНК.

Таксономический состав прокариот в образцах был идентичным, вне зависимости от использованного метода (рис. 2, 3). В образцах были обнаружены представители доменов Bacteria и Archaea. Наиболее разнообразно были представлены бактериальные филумы Proteobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Cyanobacteria и др. Археи были представлены филумом Euryarchaeota. Также в образцах определялись хлоропласты диатомовых водорослей. Протеобактерии включали классы Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria.

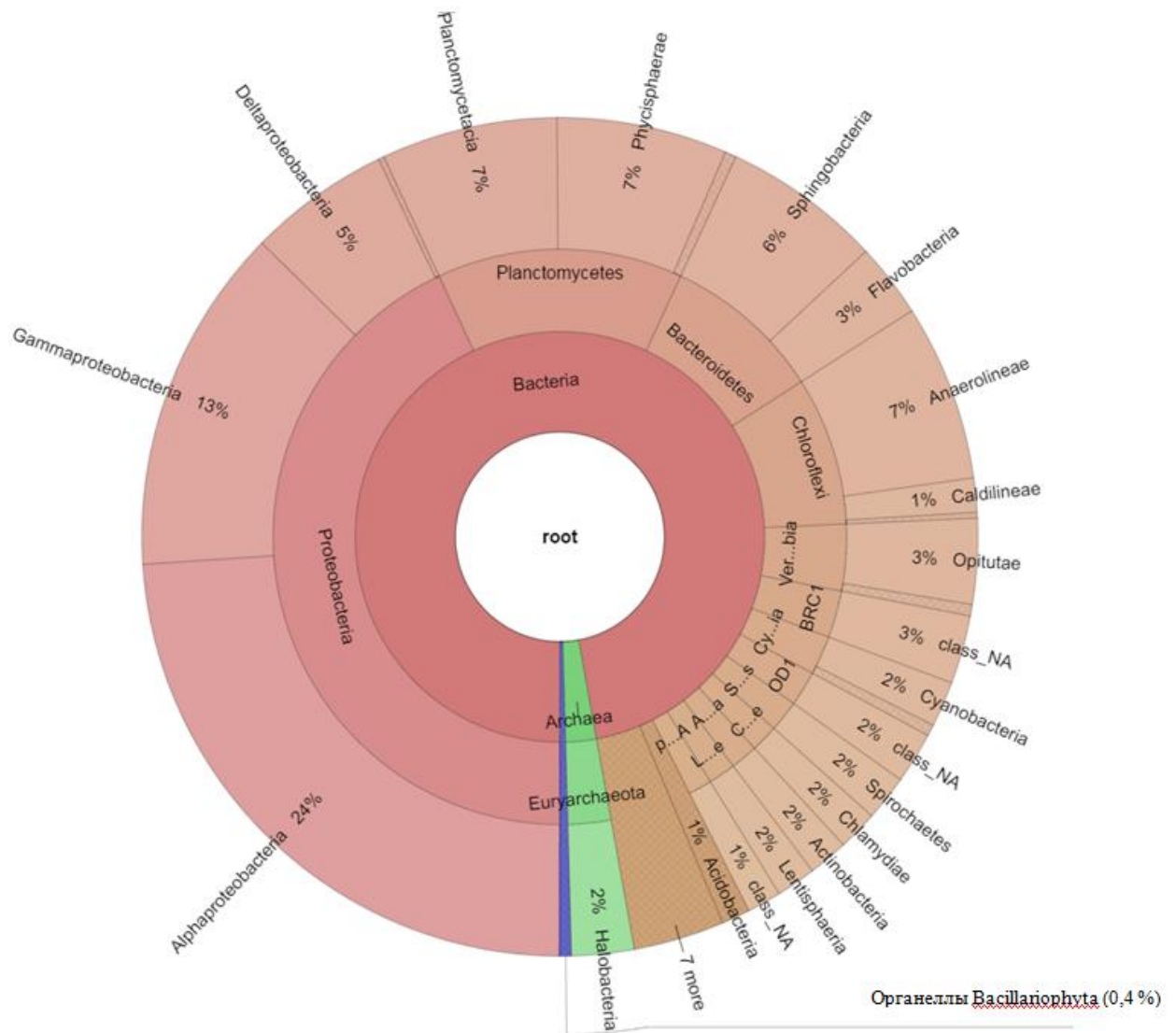


Рис. 2. Таксономический состав прокариот на уровне класса при использовании основной методики выделения ДНК.

Сопоставление списков филумов прокариот, обнаруженных в исследуемых образцах, также не выявило достоверных различий (табл. 2, 3). Как в составе бактерий, так и в составе архей таксоны были сходными.

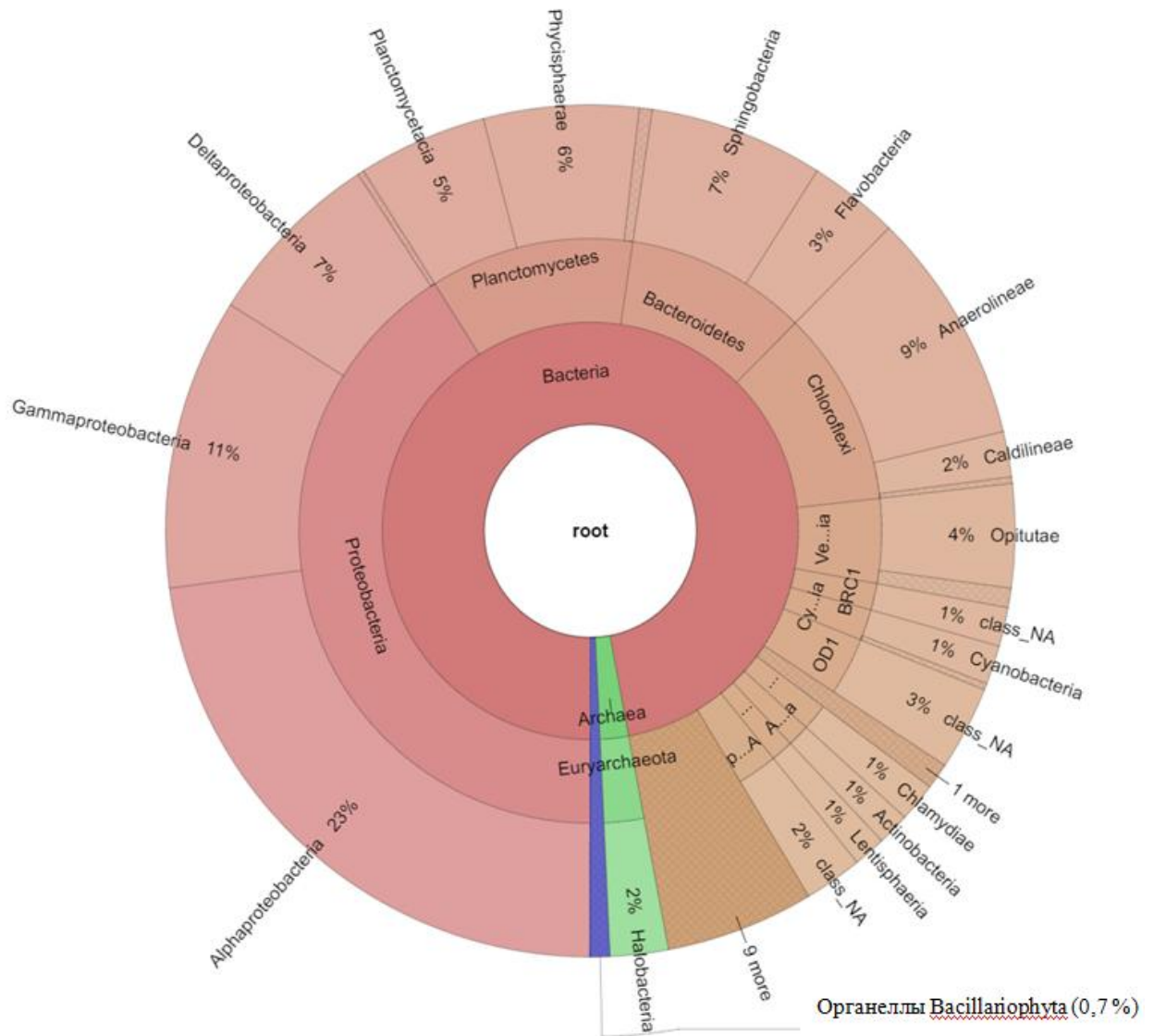


Рис. 3. Таксономический состав прокариот на уровне класса при использовании методики выделения ДНК с модификацией.

В то же время относительная численность микроорганизмов на уровне таксонов более мелкого ранга значительно отличалась (рис. 4). ОТЕ, которые были представлены более чем 50 ридами, распределились по 10 крупным таксонам при применении основной методики и по 6 – в случае применения методики с модификацией. В образце, в котором для выделения ДНК использовалась основная методика, преобладали бактерии класса Alphaproteobacteria, на долю которых приходилось более 60% всех ридов. Доли Gammaproteobacteria и Bacteroidetes составили по 10%. Удельная численность остальных крупных таксонов, включая цианобактерии, не превышала 3%.



Таблица 2. Сравнительная оценка таксономического состава бактерий (на уровне филумов) по результатам секвенирования образцов ДНК, выделенных разными методами.

Основная методика		phylum	Методика с модификацией	
	%		%	
	0.0	Ignivibacteriae	0.2	*
	0.7	"Acidobacteria"	0.2	*
	0.9	Hydrogenedentes	0.0	
	0.0	Firmicutes	0.2	*
	1.5	Parcubacteria	1.7	*
	0.4	Candidatus Saccharibacteria	0.5	*
	4.2	"Verrucomicrobia"	4.9	*
	0.2	"Deinococcus-Thermus"	0.2	*
	3.3	"Chloroflexi"	4.7	*
	1.1	"Spirochaetes"	0.7	*
	1.3	"Actinobacteria"	1.2	*
	1.5	"Chlamydiae"	1.5	*
	8.8	"Planctomycetes"	6.9	*
	8.8	"Bacteroidetes"	9.8	*
	40.4	"Proteobacteria"	37.8	*
	2.2	Cyanobacteria/Chloroplast	2.2	*
	22.4	unclassified Bacteria	24.8	*

(\* = significantly different at 0.01)

Таблица 3 Сравнительная оценка таксономического состава архей (на уровне филумов) по результатам секвенирования образцов ДНК, выделенных разными методами.

Основная методика		phylum	Методика с модификацией	
	%		%	
	2.0	Woesearchaeota	1.5	*
	0.2	Pacearchaeota	0.0	
	0.2	unclassified Archaea	0.7	*

(\* = significantly different at 0.01)

В образце, в котором для выделения ДНК использовали методику с модификацией, преобладали Bacteroidetes и Cyanobacteria, на долю которых приходилось более 40 и 20%, соответственно. Следующими по численности были Alphaproteobacteria и Gammaproteobacteria (более 10% каждый). На долю Planctomycetes и Gammaproteobacteria приходилось около 5%.

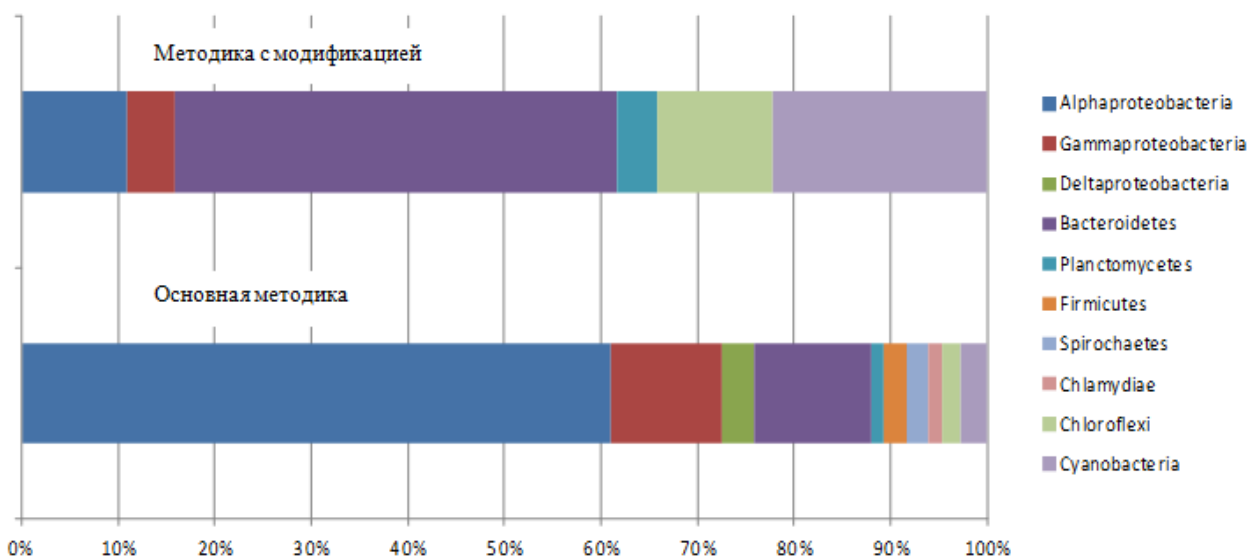


Рис. 4. Удельная численность прокариот разных доминирующих филумов (классов для протеобактерий).

Сравнивая полученные данные с описанными в литературе сведениями о структуре и составе микробных матов, в частности о доминировании и структурообразующей роли цианобактерий во всех типах матов [11, 12], можно заключить, что основная методика экстракции ДНК не позволяет получить одинаковый выход ДНК из всех групп микроорганизмов, присутствующих в сообществе. Это, в частности, отражается в заниженной удельной численности цианопрокариот и представителей филума *Bacteroidetes*. Удельная численность представителей филума *Cyanobacteria* при использовании модифицированной методики выделения ДНК оказалась в 10 раз выше, чем при использовании основной методики, что, вероятно, объясняется более эффективным разрушением плотной клеточной стенки цианобактерий под действием лизоцима. Кроме того, преобладание *Bacteroidetes*, выявленное в образце, приготовленном по модифицированной методике, характерно для микробного состава донных отложений и хорошо согласуется с результатами других исследований [13].

Обнаружение среди доминирующих таксонов *Alfaproteobacteria*, представленных пурпурными несерными бактериями порядка *Rhodospirillales*, и *Gammaaproteobacteria*, представленных пурпурными серными бактериями *Chromatiales*, является закономерным. Присутствие этих групп бактерий, получающих энергию в процессе аноксигенного фотосинтеза, характерно для цианобактериальных матов различных локализаций. Обнаружение анаэробных нитчатых бактерий из филума *Chloroflexi* в высокой численности не удивительно, в связи с наличием в бактериальных матах микрозон, резко различающихся по своим физико-химическим характеристикам, в частности, по наличию и концентрации кислорода [14].

Таким образом, лишь с использованием модифицированной методики выделения ДНК в микробном мате устьевой части солоноватой р. Чернавка выявлены в качестве доминирующих ОТЕ, принадлежащие микроорганизмам основных функциональных групп, осуществляющих процессы оксигенного и аноксигенного фотосинтеза, деструкции органического вещества в аэробных и анаэробных условиях и других процессах, характерных для бактериальных матов.

Следует отметить, что полученные результаты нельзя считать полностью отражающими реальную структуру сообщества изученного мата. Искажение может наблюдаться за счет неоднородности образца, в частности

слоистой структуры мата, находящегося на границе водной среды и грунта, наличия фрагментов донного осадка, к которым преципитируются микроорганизмы. Поэтому в будущем для более полного и равномерного выделения ДНК из мата следует использовать протокол, включающий наиболее эффективный известный в настоящее время метод разрушения клеток, в частности механическую гомогенизацию.

### **Заключение**

В результате проведенного исследования показано, что модификация метода химического лизиса, заключающаяся в использовании лизоцима, не изменяя данные по таксономическому составу сообщества, приводит к получению более близких к реальности данных по удельной численности отдельных таксонов прокариот. Использование дополнительной обработки образца лизоцимом способствует более эффективному разрушению клеточных стенок прокариот, в частности цианобактерий, и экстракции ДНК из всех присутствующих групп микроорганизмов в равной степени. Таким образом, для выделения ДНК из образцов циано-бактериального мата предпочтительно использовать модификацию метода химического лизиса с дополнительной обработкой клеток лизоцимом или механической гомогенизацией для более полного разрушения клеточных стенок всех микроорганизмов сообщества.

*(Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН и поддержана грантами РФФИ №№ 14-04-01796, 16-44-560316 p-a, 16-44-560234 p-a).*

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Stahl D.A., Hullar M., Davidson S. The Structure and Function of Microbial Communities. In: Dworkin M., editor-in-chief. Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., eds. Prokaryotes. New York: Springer-Verlag. 2006. 1: 299-327.
2. Брюханов А.Л., Рыбак К.В., Нетрусов А.И. Молекулярная микробиология: Учебник для вузов. М.: Издательство Московского университета, 2012. 480с.
3. Balestrazzi A., Bonadei M., Cinzia C. et al. DNA extraction from soil: comparison of different methods using spore-forming bacteria and the swrAA gene as indicators. *Annals of Microbiology*. 2009. 59 (4): 827-832.
4. Lear G., Dong Y., Lewis G. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010. 98: 567-571.
5. Narayan A., Jain K., Shah A.R., Madamwar D. An efficient and cost-effective method for DNA extraction from athalassohaline soil using a newly formulated cell extraction buffer. *3 Biotech*. 2016. 6: 62.
6. Santosa D.A. Rapid Extraction and Purification of Environmental DNA for Molecular Cloning Applications and Molecular Diversity Studies. *Molecular Biotechnology*. 2001. 17 (1): 59-64.
7. Белькова Н.Л. Модифицированная методика выделения суммарной ДНК из водных проб и грунтовых вытяжек методом ферментативного лизиса. В кн.: Молекулярно-

генетические методы анализа микробных сообществ. Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009: 53-63.

8. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013. 41(1): 1-11.
9. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010. 26 (19): 2460-2461.
10. Huse S.M., Mark Welch D.B., Voorhis A. et al. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinformatics*. 2014. 15: 41.
11. Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B., Kalashnikova O.M. et al. Biogeochemical Processes in the Algal-Bacterial Mats of the Urinskii Alkaline Hot Spring. *Microbiology*. 2006. 75 (5): 611-620.
12. Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Kozyreva L.P. et al. Structure and Formation Properties of the Haloalkaliphilic Community of Lake Khilganta. *Microbiology*. 2011. 80 (2): 237-243.
13. Mamaeva E.V., Galach'yants Yu.P., Khabudaev K.V. et al. Metagenomic Analysis of Microbial Communities of the Sediments of the Kara Sea Shelf and the Yenisei Bay *Microbiology*. 2016. 85 (2): 220-230.
14. Кашкак Е.С., Белькова Н.Л., Данилова Э.В. Идентификация доминирующих генотипов в микробных сообществах углекислых минеральных источников Жойган (Восточный Саян). *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*. 2014. 7: 37-44.

*Поступила 20.10.2016*

*(Контактная информация: Селиванова Елена Александровна – к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел/факс (3532) 77-54-17; E-mail: [selivanova-81@mail.com](mailto:selivanova-81@mail.com))*

---

---

## LITERATURA

1. Stahl D.A., Hullar M., Davidson S. The Structure and Function of Microbial Communities. In: Dworkin M., editor-in-chief. Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E., eds. *Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag, 2006. Vol. 1: 299-327.
2. Bryuhanov A.L., Rybak K.V., Netrusov A.I. *Molekulyarnaya mikrobiologiya: Uchebnik dlya vuzov*. M.: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta, 2012. 480s.
3. Balestrazzi A., Bonadei M., Cinzia C. et al. DNA extraction from soil: comparison of different methods using spore-forming bacteria and the swrAA gene as indicators. *Annals of Microbiology*. 2009. 59 (4): 827-832.
4. Lear G., Dong Y., Lewis G. Comparison of methods for the extraction of DNA from stream epilithic biofilms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010. 98: 567-571.
5. Narayan A., Jain K., Shah A.R., Madamwar D. An efficient and cost-effective method for DNA extraction from athalassohaline soil using a newly formulated cell extraction buffer. *3 Biotech*. 2016. 6: 62.
6. Santosa D.A. Rapid Extraction and Purification of Environmental DNA for Molecular Cloning Applications and Molecular Diversity Studies. *Molecular Biotechnology*. 2001. 17 (1): 59-64.
7. Бел'кова Н.Л. Модифицированная методика выделения суммарной ДНК из водных проб и грунтовых вытязок методом ферментативного лизиса. В кн.: *Molekulyarno-geneticheskiye metody analiza mikrobnykh soobshchestv vnutrennih vodoyemov Rossii: Uchebno-metodicheskoe posobie / Yaroslavl': Izd-vo ООО «Prinhaus», 2009: 53-63.*
8. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene

- PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013. 41(1): 1-11.
9. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010. 26 (19): 2460-2461.
  10. Huse S.M., Mark Welch D.B., Voorhis A. et al. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinformatics*. 2014. 15: 41.
  11. Bryanskaya A.V., Namsaraev Z.B., Kalashnikova O.M. et al. Biogeochemical Processes in the Algal-Bacterial Mats of the Urinskii Alkaline Hot Spring. *Microbiology*. 2006. 75 (5): 611-620.
  12. Tsyrenova D.D., Bryanskaya A.V., Kozyreva L.P. et al. Structure and Formation Properties of the Haloalkaliphilic Community of Lake Khilganta. *Microbiology*. 2011. 80 (2): 237-243.
  13. Mamaeva E.V., Galach'yants Yu.P., Khabudaev K.V. et al. Metagenomic Analysis of Microbial Communities of the Sediments of the Kara Sea Shelf and the Yenisei Bay *Microbiology*. 2016. 85 (2): 220-230.
  14. Kashkak E.S., Bel'kova N.L., Danilova E.V. Identifikatsiya dominiruyuschih genotipov v mikrobnih soobshchestvah uglekislyh mineral'nyh istochnikov Zhoigan (Vostochnyi Sayan). *Izvestiya Irkutskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya «Biologiya. Ekologiya»*. 2014. 7: 37-44.

**Образец ссылки на статью:**

Селиванова Е.А., Хлопко Ю.А., Пошвина Д.В., Гоголева Н.Е., Борисов С.Д., Плотников А.О. Сравнительная характеристика методов выделения тотальной днк из образцов циано-бактериальных матов. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2016. 4: 12с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-4/Articles/SEA-2016-4.pdf>).