

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

On-line версия журнала на сайте

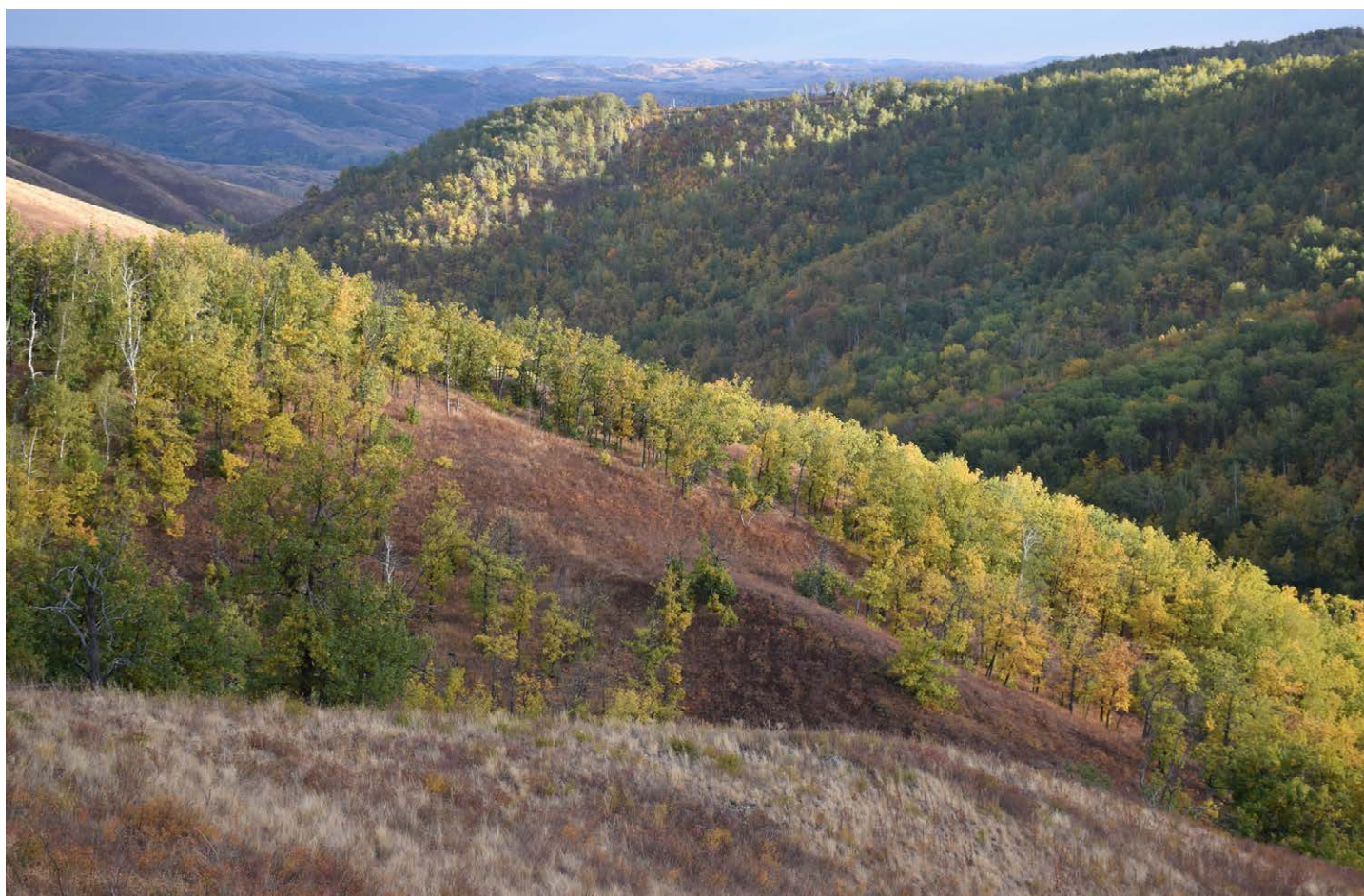
<http://www.elmag.uran.ru>



2017
ГОД ЭКОЛОГИИ
В РОССИИ

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2017

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН

ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2017

УДК 579.2

Д.В. Пошвина, Е.А. Селиванова, Ю.А. Хлопко, А.О. Плотников

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ 18S МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ РАЗНООБРАЗИЯ ПРОТИСТОВ В ГИПЕРГАЛИННЫХ ВОДОЕМАХ

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Оценка разнообразия протистов в гипергалинных озерах методом высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили образцы воды гипергалинных водоемов - оз. Тузлучное (Оренбургская область), оз. Кулат (Челябинская область). Тотальную ДНК выделяли комбинированным методом, включающим механическую гомогенизацию и ферментативный лизис. 18S метагеномное секвенирование ДНК-библиотек проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Данные по составу сообществ обрабатывали комплексом биоинформатических программ.

Результаты. Впервые методом высокопроизводительного секвенирования исследовано разнообразие эукариот двух озёр, сходных по минерализации - Тузлучное (Оренбургская область) и Кулат (Челябинская область). В озере Тузлучное преобладали представители филума *Chlorophyta*. Доминирующее положение занимали зеленые водоросли рода *Nannochloris*. Среди выявленных протистов многие не идентифицированы, и возможно представляют собой новые виды. Видовое разнообразие протистов озера Кулат было незначительным. Доминирующие ОТЕ были представлены жаброногими ракообразными *Branchiopoda*.

Заключение. Видовое богатство эукариот озера Тузлучное было значительным, зарегистрировано 48 ОТЕ, из которых 45 были классифицированы как протисты, тогда как в озере Кулат зарегистрировано 17 ОТЕ, из которых только 4 были классифицированы как протисты, что, по-видимому, связано с массовым развитием рачков *Artemia salina*. Таким образом, современные молекулярно-генетические методы позволяют получать полную информацию о составе сообществ эукариот в соленых водоемах.

Ключевые слова: гипергалинные водоемы, протисты, метагеномный анализ, высокопроизводительное секвенирование.

D.V. Poshvina, E.A. Selivanova, Yu.A. Khlopko, A.O. Plotnikov

APPLICATION OF 18S METAGENOMIC SEQUENCING FOR EVALUATING PROTISTAN DIVERSITY IN HYPERSALINE WATER BODIES

Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Objective. Evaluation of the diversity of protists in the hypersaline lakes with high-throughput sequencing.

Materials and methods. For the study samples of water were taken from hypersaline lakes Tuzluchnoe (Orenburg region) and Kulat (Chelyabinsk region). Total DNA was extracted by a combined method, including mechanical homogenization and enzymatic lysis. 18S metagenomic sequencing of the DNA libraries was conducted in the MiSeq sequencer (Illumina). Data analysis was carried out using a complex of bioinformatic programs.

Results. For the first time, diversity of eukaryotes has been studied with high-throughput sequencing in two similar in mineralization lakes Tuzluchnoe (Orenburg region) and Kulat (Chelyabinsk region). Representatives of the phylum *Chlorophyta* prevailed in Tuzluchnoe Lake. Green algae of the genus *Nannochloris* were predominant. Many of the OTU revealed were not

identified and possibly represent new species. Species diversity of protists in Kulat Lake was narrow. The dominant OTUs were represented by the fairy shrimps *Branchiopoda*.

Conclusion. Species richness of the eukaryotes in Tuzluchnoe Lake was significant, 48 OTU were recorded, 45 of which were classified as protists, as well as 17 OTUs in Kulat Lake were recorded, including 4 OTUs of protists. That fact is apparently associated with mass development of *Artemia salina* in Kulat Lake. Thus, modern molecular genetic methods allow to obtain complete information on the composition of eukaryotic communities in salt water bodies.

Key words: hypersaline water bodies, protists, metagenomic analysis, high-throughput sequencing.

Введение

Гипергалинные озера являются одной из самых экстремальных сред обитания на планете. Их можно найти на каждом континенте, в основном в аридных и полуаридных зонах, где они являются типичным компонентом ландшафта [2].

Наиболее интенсивно изучаются галофильные прокариоты – бактерии и археи, тогда как разнообразие эукариотических микроорганизмов (протистов) остается слабо изученным [11]. Наиболее известными галофилами являются зеленые водоросли рода *Dunaliella* и некоторые грибы [10, 13], хотя известны и экстремально галофильные или галотолерантные простейшие [3, 7, 12]. Существуют лишь единичные работы, посвященные сообществам протистов в континентальных соленых водоемах. В частности, известны исследования гипергалинного австралийского озера Тирель [8], экстремально гипергалинных соляных прудов в Испании и Чили [14].

Исследования протистов континентальных гипергалинных водоемов с экстремальной соленостью на территории России с применением высокопроизводительного секвенирования до настоящего момента не проводились. Определенный интерес представляют континентальные соленые озера Кулат (Челябинская область) и Тuzлучное (Оренбургская область), в которых нами впервые дана оценка разнообразия сообщества эукариот методом высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы

Пробы воды в объеме 15-50 мл фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Тотальную ДНК с фильтров выделяли комбинированным методом, включающим механическую гомогенизацию с последующим ферментативным лизисом [1]. Дополнительно проводили инкубацию с лизоцимом. К образцам добавляли 400 мкл 1М Трис-НСl буфера и го-

могенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser LT (QIAGEN, Германия) со стеклянными шариками диаметром 1,4 мм в течение 1 мин при частоте 50 Гц. Далее добавляли 50 мкл 1М Трис-НСl с 5 мкг лизоцима и инкубировали 60 мин при 37°C. Затем в смесь вносили 50 мкл 10% додецилсульфата натрия (итоговая концентрация составляла 1%) и 2 мкл протеиназы К и инкубировали 60 мин при 60°C. После экстракции фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом (25:24:1) и хлороформ-изоамиловым спиртом (24:1) ДНК в водной фазе осаждали в трехкратном объеме абсолютного спирта с добавлением 40 мкл 10М ацетата аммония при -20°C в течение 14-18 ч. После центрифугирования и двойного отмывания 80% этанолом, ДНК высушивали и элюировали в 30 мкл воды MQ. Для исключения возможной контаминации использовали отрицательный контроль, в котором 100 мкл деионизированной автоклавированной воды обрабатывали по описанной выше методике. Чистоту ДНК контролировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию ДНК определяли при помощи флуориметра Quantus (Promega, США) с использованием набора Quanti Fluor dsDNA (Promega, США). ДНК библиотеки для 18S метагеномного секвенирования были созданы по протоколу Illumina (http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с праймерами к региону V4 18S рРНК (прямой TAREuk454FWD1, обратный TAREukRev3). Высокопроизводительное секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реактивов MiSeq Reagent Kit V3 (Illumina, США) в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН. Данные по составу сообществ обрабатывались комплексом биоинформатических программ USEARCH 9.0.2132_win32 [5], включая слияние парных ридов, фильтрацию по качеству ридов и отбор по длине ампликонов (минимальный размер - 300 bp). Таксономическую классификацию ОТЕ проводили с использованием веб платформы VAMPS (база данных SILVA 119) [9].

Пробы воды из оз. Тузлучное были отобраны в октябре 2015 г., из оз. Кулат – в июле 2015 г. Согласно Венецианской классификации оз. Тузлучное (51°08'43.6"с.ш. 55°00'07.8"в.д.) является гипергалинным, соленость в нем составляет 150 г/л, оз. Кулат (55°0'45"с.ш. 61°56'48"в.д.) также является гипергалинным, соленость в нем составляет 170 г/л; состав основных ионов

представлен в таблице 1.

Таблица 1. Химический состав воды исследуемых озер (г/л)

Ион	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	HCO ₃ ⁻
Оз. Тузлучное	56,60		0,48	0,92	57,30	3,06	не изм.
Оз. Кулат	78,61	0,61	6,56	4,01	106,35	6,13	0,549

Результаты и обсуждение

По результатам метагеномного секвенирования фрагментов гена 18S в планктонном образце озера Тузлучное выявлено 65063 ридов эукариот, составивших 48 операционных таксономических единиц (ОТЕ) и относящихся к 30 родам, 18 классам и 10 филумам. Кроме протистов выявлены гены 18S высших растений (*Streptophyta*) и планктонных ракообразных (*Arthropoda*) (табл. 2).

Таблица 2. Таксономическая характеристика фрагментов гена 18S многоклеточных эукариот в исследуемых озерах

№ п/п	Филум	Класс	Порядок	Семейство	Род / Вид	Озеро Тузлучное	Озеро Кулат
1	<i>Arthropoda</i>	<i>Branchiopoda</i>	<i>n/o</i>	<i>n/o</i>	<i>n/o</i>	1	12
2	<i>Streptophyta</i>	<i>Liliopsida</i>	<i>n/o</i>	<i>n/o</i>	<i>n/o</i>	0	1
3	<i>Streptophyta</i>	-	<i>Asterales</i>	<i>n/o</i>	<i>n/o</i>	1	0
4	<i>Streptophyta</i>	-	<i>Caryophyllales</i>	<i>n/o</i>	<i>n/o</i>	1	0

Примечание (здесь и для табл. 3): *n/o* – таксон не идентифицирован по базе данных.

В этом озере наиболее разнообразно были представлены филумы *Chlorophyta*, *Ciliophora* и *Ochrophyta*, на долю которых приходилось более 51% всех обнаруженных ОТЕ (рис. 1). ОТЕ, неклассифицированные на уровне филума, составили 21% от всех полученных сиквенсов. Кроме того, были обнаружены представители таких филумов, как *Oomycota*, *Cryptophyta*, *Dinophyta* и *Cercozoa*. Среди динофитовых водорослей определен род *Woloszynskia*. В составе филума *Cercozoa* были описаны неидентифицированные представители семейства *Vampyrellidae*.

Наибольшей численности достигали представители филума *Chlorophyta*, на долю которых приходилось более 70% всех ридов. Среди *Chlorophyta* выявлены одноклеточные зеленые водоросли родов *Nannochloris*, *Chlamydomonas* и *Choricystis*. Более 13% полученных ридов

были представлены грибами филума *Chytridiomycota*. Среди *Ciliophora* были выявлены виды *Chlamydodon salinus*, *Balantidion pellucidum*, *Cinetochilum ovale*, *Fabrea salina*, а также представители родов *Ancistrum* и *Amphorellopsis*. Гетеротрофные жгутиконосцы *Heterolobosea* sp. были представлены двумя ОТЕ. Филум *Ochrophyta* содержал виды *Navicula salinicola* и *Nitzschia palea*, а также представителей родов *Choanoeca* и *Chaetoceros*.

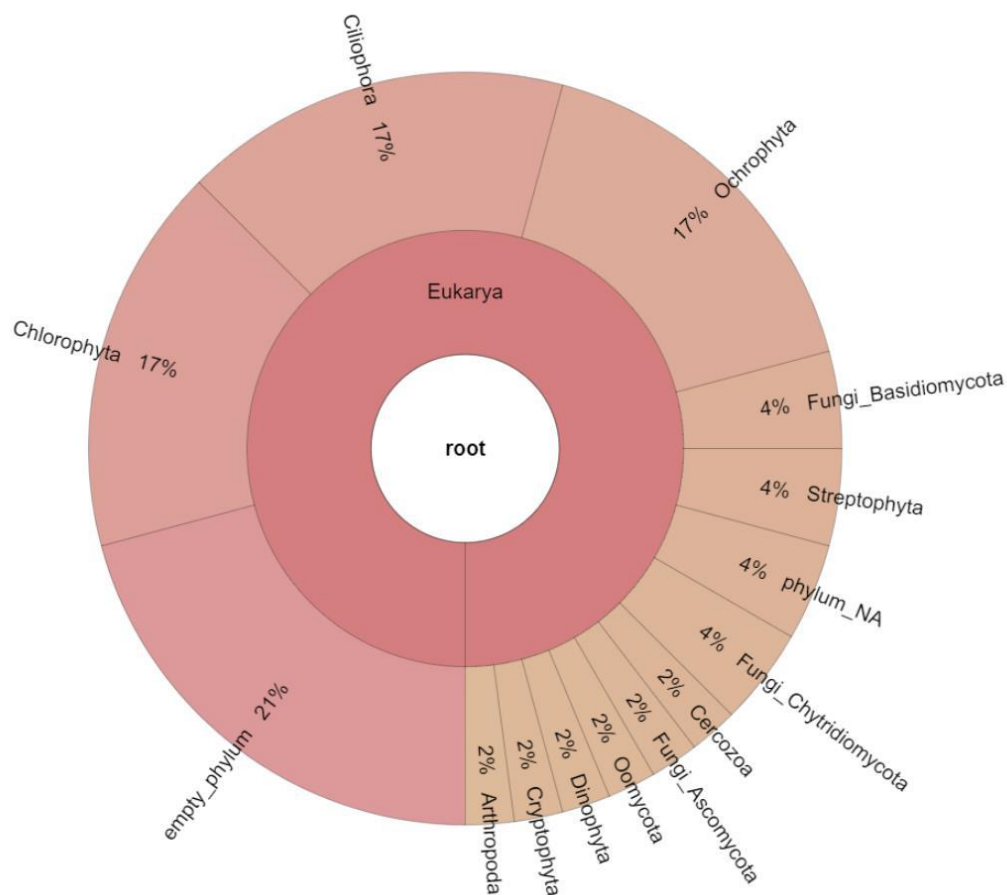


Рис. 1. Таксономический состав эукариот на уровне филума в озере Тузлучное (приведена доля ОТЕ, принадлежащих соответствующему таксону, в % от числа всех ОТЕ).

Анализ удельной численности эукариот на уровне рода (табл. 4) продемонстрировал доминирование зелёных одноклеточных водорослей рода *Nannochloris*, на долю которых приходилось 63% всех выявленных ридов. Среди гетеротрофных микроорганизмов численно преобладали инфузории *Ancistrum* sp. и *Gonostomum* sp., на долю которых приходилось 2,1% и 1,21% всех ридов соответственно.

Таблица 3. Таксономическая характеристика фрагментов гена 18S одноклеточных эукариот в исследуемых озерах

№ п/п	Филум	Класс	Порядок	Семейство	Род / Вид	Озеро Тузлучное	Озеро Кулат
1	<i>Cercozoa</i>	-	-	<i>Vampyrellidae</i>	н/о	1	0
2					<i>Chlamydomonas kuwadae</i>	0	1
3					<i>Chlamydomonas sp.</i>	2	0
4			н/о	н/о	н/о	2	1
5			<i>Chlorellales</i>	<i>Chlorellaceae</i>	<i>Nannochloris sp.</i>	3	0
6			-	-	<i>Choricystis</i>	1	0
7		<i>Heterotrichea</i>	<i>Heterotrichida</i>	<i>Climacostomidae</i>	<i>Fabrea salina</i>	1	0
8		<i>Litostomatea</i>	<i>Haptorida</i>	<i>Spathidiidae</i>	<i>Balantidion pellucidum</i>	1	0
9			<i>Philasterida</i>	<i>Cinetochilidae</i>	<i>Cinetochilum ovale</i>	1	0
10			<i>Thigmatrichida</i>	<i>Ancistridae</i>	<i>Ancistrum strain ZZ-2011</i>	1	0
11		<i>Phyllopharyngea</i>	<i>Chlamyodontida</i>	<i>Chlamydodontidae</i>	<i>Chlamydon salinus</i>	1	0
12			<i>Sporodotrichida</i>	<i>Oxytrichidae</i>	<i>Gonostomum sp.</i>	1	0
13			<i>Tintinnida</i>	<i>Tintinnidae</i>	<i>Amphorellopsis sp.</i>	2	1
14		н/о	н/о	н/о	н/о	1	0
15	<i>Cryptophyta</i>	<i>Cryptophyceae</i>	<i>Cryptomonadales</i>	н/о	н/о	1	0
16	<i>Dinophyta</i>	<i>Dinophyceae</i>	<i>Lophodiniiales</i>	<i>Lophodiniaceae</i>	<i>Woloszynskia sp.</i>	1	0
17	<i>Fungi_Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	0
18				<i>Cystoflobasidiaceae</i>	<i>Udeniomyces puniceus</i>	1	0
19				<i>Incertaesedis</i>	<i>Syzygospora effibulata</i>	1	0
20			<i>Polychytriales</i>	-	<i>Karlingiomyces asterocystis</i>	1	0
21			<i>Spizellomycetales</i>	н/о	н/о	1	0
22			-	-	<i>Navicula salinicola</i>	1	1
23			-	-	<i>Nitzschia palea</i>	1	0
24				-	<i>Chrysolepidomonas dendrolepidota</i>	1	0
25				-	<i>Paraphysomonas sp.</i>	1	0
26		<i>Craspedophyceae</i>	<i>Craspedomonadales</i>	<i>Salpingoecaceae</i>	<i>Choanoeca sp.</i>	2	0
27		<i>Mediophyceae</i>	-	-	<i>Chaetoceros sp.</i>	1	0
28		н/о	н/о	н/о	н/о	1	0
29	<i>Oomycota</i>	<i>Hyphochytrrea</i>	<i>Hyphochytriales</i>	н/о	н/о	1	0
30	-	<i>Ichthyosporea</i>	<i>Ichthyophonida</i>	-	<i>Anurofeca sp.</i>	2	0
31	-	-	<i>Bicosoecida</i>	<i>Siluaniiidae</i>	н/о	1	0
32	-	-	<i>Bicosoecida</i>	-	<i>Caecitellus sp.</i>	1	0
33	-	-	<i>Choanoflagellida</i>	<i>Stephanoecidae</i>	н/о	1	0
34	-	-	<i>Eccrinales</i>	<i>Eccrinaceae</i>	<i>Eccrinidus flexilis</i>	1	0
35	-	-	<i>Leptomyxida</i>	<i>Flabellulidae</i>	<i>Rhizamoeba saxonica</i>	1	0
36	-	-	<i>Leptomyxida</i>	<i>Leptomyxidae</i>	<i>Leptomyxa sp.</i>	2	0
37	-	-	-	<i>Hartmannellidae</i>	<i>Hartmannella sp.</i>	1	0
38	-	<i>Heterolobosea</i>	н/о	н/о	н/о	2	0

Таблица 4. Удельная численность эукариотных ОТЕ доминирующих родов (>1%) в планктоне озера Тузлучное

Род	%
<i>Nannochloris</i>	63.2
<i>Chlorophyceae sp.</i>	13.8
<i>Spizellomycetales sp.</i>	7.7
<i>Navicula</i>	4.0
<i>Hyphochytriales sp.</i>	3.6
<i>Ancistrum</i>	2.1
<i>Chlamydomonas</i>	1.9
<i>Gonostomum</i>	1.2

Таким образом, доминирующий комплекс оз. Тузлучное, наряду с представителями рода *Nannochloris*, включал в себя диатомовые водоросли рода *Navicula*, зелёные водоросли *Chlamydomonas*, инфузории родов *Ancistrum* и *Gonostomum*, неидентифицированные зелёные водоросли класса *Chlorophyceae sp.*, ближайшим гомологом которого оказался некультивируемый изолят *Dunaliella sp.* из гипергалинного озера Тиррелл (Австралия) [8].

Кроме того, среди доминантов были зарегистрированы гифохитридиевые грибы порядка *Hyphochytriales sp.* и хитридиевые грибы порядка *Spizellomycetales sp.*

По данным метагеномного секвенирования фрагментов гена 18S в планктонном образце из озера Кулат определено 59705 ридов эукариот, составивших 17 операционных таксономических единиц и относящихся к 5 родам, 5 классам, 5 филумам. Установлено, что подавляющее большинство ОТЕ (12) принадлежали жаброногим ракообразным *Arthropoda*, что составило 71% (рис. 2). Наиболее близкой известной последовательностью из GenBank (NCBI) для них оказалась *Artemia salina* [4].

Среди протистов зарегистрированы филумы *Chlorophyta*, *Ciliophora* и *Ochrophyta*. *Chlorophyta* были представлены двумя ОТЕ – *Chlamydomonas kuwadae* и неидентифицированным представителем класса *Chlorophyceae sp.*, ближайшим гомологом которого, согласно данным GenBank (NCBI), является одноклеточная зелёная водоросль вида *Dunaliella primolecta* [6]. Филум *Ochrophyta* был представлен одним видом – *Navicula salinicola*.

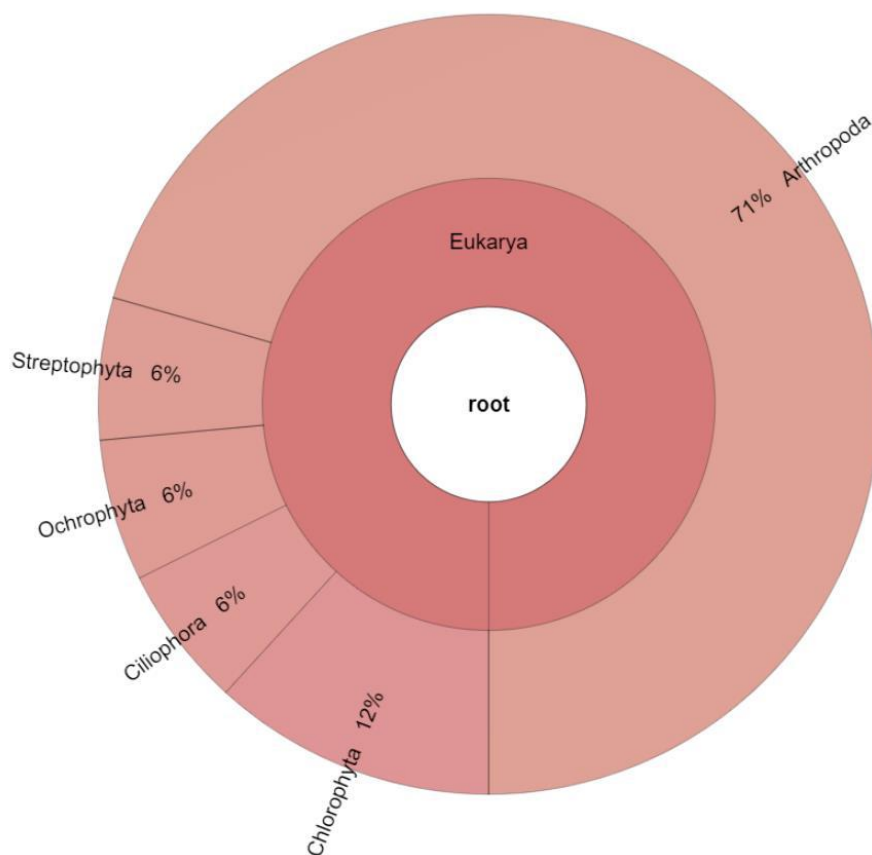


Рис. 2. Таксономический состав эукариот на уровне филума в озере Кулат (приведена доля ОТЕ, принадлежащих соответствующему таксону, в % от числа всех ОТЕ).

Низкое видовое разнообразие протистов в озере Кулат, по-видимому, в значительной мере связано с массовым развитием жаброногих ракообразных класса *Branchiopoda*.

Заключение

В результате проведенного исследования впервые методом высокопроизводительного секвенирования изучено биоразнообразие эукариот гипергалинных озер Тузлучное и Кулат. Видовое богатство эукариот озера Тузлучное было значительным, зарегистрировано 48 ОТЕ, из которых 45 были классифицированы как протисты. По численности и таксономическому разнообразию в озере Тузлучное преобладали зеленые водоросли. Определен доминирующий комплекс микроорганизмов, представленный зелеными одноклеточными водорослями *Nannochloris sp.* и *Chlamydomonas sp.*, инфузориями *Ancistrum sp.* и *Gonostomum sp.* Среди выявленных микроорганизмов многие не идентифицированы, и, возможно, представляют собой новые таксоны. Ви-

довое богатство эукариот озера Кулат было незначительным, зарегистрировано 18 ОТЕ, из которых только 4 были классифицированы как протисты, что, по-видимому, связано с массовым развитием рачков *Artemia salina*.

Таким образом, современные молекулярно-генетические методы позволяют получать полную информацию о составе сообществ эукариот в соленых водоемах. Тем не менее, данные, полученные с применением метагеномного подхода, опубликованы только по некоторым континентальным гипергалинным водоемам. Метагеномный подход позволяет не только получить полную характеристику состава и структуры сообщества эукариотических микроорганизмов, но также сравнивать между собой различные местообитания, оценивать динамику сообществ, выявлять микроорганизмы новых филогенетических линий и в совокупности с классическими методами – описывать новые виды, роды и более крупные таксоны.

(Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН и поддержана грантом РФФИ № 17-04-02079)

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Anufrieva E.V., Shadrin N.V., Shadrina S.N. History of Research on Biodiversity in Crimean Hypersaline Waters. *Arid Ecosystems*. 2017. 7(1): 52-58.
3. Cho B.C. Heterotrophic Flagellates in Hypersaline Waters. In: Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. (eds.) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005: 543-549.
4. Cleary A.C., Durbin E.G. and Rynearson T.A. Krill feeding on sediment in the Gulf of Maine (North Atlantic) Mar. Ecol. Prog. Ser. 2012. 455: 157-172.
5. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010. 26(19): 2460-2461.
6. Fulnečková J., Ševčíková T., Lukešová A., Sýkorová E. Transitions between the Arabidopsis-type and the human-type telomere sequence in green algae (clade Caudivolvoxa, Chlamydomonadales). *Chromosoma*. 2016. 125: 437-451.
7. Hauer G., Rogerson A. Heterotrophic Protozoa from Hypersaline Environments. In: Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. (eds.) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005: 521-539.
8. Heidelberg K.B., Nelson W.C., Holm J.B., Eisenkolb N., Andrade K., Emerson J.B. Characterization of eukaryotic microbial diversity in hypersaline Lake Tyrrell, Australia. *Front Microbiol*. 2013. 4: 115.
9. Huse S.M., Mark Welch D.B., Voorhis A., Shipunova A., Morrison H.G., Eren A.M., Sogin M.L. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinformatics*. 2014. 15: 41.

10. Javor B. *Hypersaline Environments: Microbiology and Biogeochemistry*. Springer-Verlag, New York, 1989. 328 p.
11. Oren A. *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Kluwer Academic Publishers, Dor-drecht. Boston. London, 2002. 575p.
12. Park, J.S. & Simpson, A.G.B. Diversity of Heterotrophic Protists from Extremely Hypersaline Habitats. *Protist*. 2015. Vol. 166: 422-437.
13. Plemenitas A., Gunde-Cimerman N. Cellular Responses in the Halophilic Black Yeast *Hor-taea werneckii* to High Environmental Salinity. In Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenita's A (eds) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005: 453-470.
14. Triadó-Margarit X., Casamayor E.O. High genetic diversity and novelty in planktonic protists inhabiting coastal high salinity water bodies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. 85: 27-36.

(Контактная информация: Плотников Андрей Олегович - к.м.н., врио директора Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, Оренбург, ул. Пионерская, д. 11; тел.: (3532) 77-54-17; e-mail: protoz@mail.ru)

Поступила 27.12.2017

LITERATURA

1. Bel'kova N.L. Modificirovannaja metodika vydelenija summarnoj DNK iz vodnyh prob i gruntovyh vytjazhek metodom fermentativnogo lizisa. V kn.: *Molekuljarno-geneticheskie metody analiza mikrobnyh soobshhestv. Raznoobrazie mikrobnyh soob-shhestv vnutrennih vodoemov Rossii: Uchebno-metodicheskoe posobie*. Jaroslavl': Izd-vo OOO «Printhus», 2009: 53-63.
2. Anufriieva E.V., Shadrin N.V., Shadrina S.N. History of Research on Biodiversity in Crimean Hypersaline Waters. *Arid Ecosystems*. 2017. 7(1): 52-58.
3. Cho B.C. Heterotrophic Flagellates in Hypersaline Waters. In: Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. (eds.) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005: 543-549.
4. Cleary A.C., Durbin E.G. and Rynearson T.A. Krill feeding on sediment in the Gulf of Maine (North Atlantic) Mar. *Ecol. Prog. Ser.* 2012. 455: 157-172.
5. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010. 26(19): 2460-2461.
6. Fulnečková J., Ševčíková T., Lukešová A., Sýkorová E. Transitions between the Arabidopsis-type and the human-type telomere sequence in green algae (clade Caudivolvoxa, Chlamydomonadales). *Chromosoma*. 2016. 125: 437-451.
7. Hauer G., Rogerson A. Heterotrophic Protozoa from Hypersaline Environments. In: Gunde-Cimerman N., Oren A., Plemenitas A. (eds.) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005: 521-539.
8. Heidelberg K.B., Nelson W.C., Holm J.B., Eisenkolb N., Andrade K., Emerson J.B. Characterization of eukaryotic microbial diversity in hypersaline Lake Tyrrell, Australia. *Front Microbiol.* 2013. 4: 115.
9. Huse S.M., Mark Welch D.B., Voorhis A., Shipunova A., Morrison H.G., Eren A.M., Sogin M.L. VAMPS: a website for visualization and analysis of microbial population structures. *BMC Bioinformatics*. 2014. 15: 41.
10. Javor B. *Hypersaline Environments: Microbiology and Biogeochemistry*. Springer-Verlag, New York, 1989. 328 p.
11. Oren A. *Halophilic Microorganisms and their Environments*. Kluwer Academic Publishers, Dor-drecht. Boston. London, 2002. 575p.
12. Park, J.S. & Simpson, A.G.B. Diversity of Heterotrophic Protists from Extremely Hyper-

- saline Habitats. *Protist*. 2015. Vol. 166: 422-437.
13. Plemenitas A., Gunde-Cimerman N. Cellular Responses in the Halophilic Black Yeast *Hortaea werneckii* to High Environmental Salinity. In Gunde-Cimerman N, Oren A, Plemenitaš A (eds) *Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2005: 453-470.
 14. Triadó-Margarit X., Casamayor E.O. High genetic diversity and novelty in planktonic protists inhabiting coastal high salinity water bodies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. 85: 27-36.

Образец ссылки на статью:

Пошвина Д.В., Селиванова Е.А., Хлопко Ю.А., Плотников А.О. Использование 18S метагеномного секвенирования для оценки разнообразия протистов в гипергалинных водоемах. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2017. 4. 10 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-4/Articles/PAO-2017-4.pdf>).