

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

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

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Falco vespertinus Linnaeus, 1766
Кобчик
Черкасов А.Ю.



2020

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2020

УДК 574.58:579.26

М.Е. Игнатенко, Т.Н. Яценко-Степанова, В.Я. Катаев, Ю.А. Хлопко

ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБИОМА ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО ШТАММА *CHLOROCOCCUM OLEOFACIENS* TRAINOR & BOLD (CHLOROPHYTA)

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

Цель. Изучить разнообразие бактерий-ассоциантов галотолерантного штамма *Chlorococcum oleofaciens* ICIS-Ch1 с использованием метода высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужила тотальная ДНК, выделенная из культур *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1, выращенных на средах с различной соленостью (0, 14 и 50‰). Тотальную ДНК выделяли комбинированным методом, включающим механическую гомогенизацию и химическую экстракцию. Библиотеки ДНК созданы в соответствии с руководством по подготовке образцов Illumina 16S Sample Preparation Guide Part # 15044223 Rev. B с праймерами для области V3-V4 гена 16S рРНК SD-Bact-0341-bS-17 и SD-Bact-0785-aA-21. Данные по составу сообществ обрабатывали комплексом биоинформатических программ.

Результаты. Результаты продемонстрировали значительное разнообразие (количество регистрируемых ОТЕ достигало 50 и более в одном образце) и динамичность (в зависимости от уровня минерализации среды, интенсивности роста водорослевой культуры) микробиома *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1. Выявлены 21 ОТЕ бактерий-ассоциантов, постоянно присутствующих в составе микробиома *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1. Большинство обнаруженных родов бактерий описаны как ассоцианты пресноводных, галотолерантных и галофильных микро- и макроскопических водорослей.

Заключение. Впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования переменного участка V3-V4 гена 16S рРНК определен состав микробиома галотолерантного штамма *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 при разных уровнях минерализации. Исследуемый микробиом характеризовался высоким разнообразием и включал представителей четырех фил: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Planctomycetes*.

Ключевые слова: высокопроизводительное секвенирование, галотолерантность, *Chlorococcum oleofaciens*, микробиом, бактерии-ассоцианты.

М.Е. Ignatenko, T.N. Yatsenko-Stepanova, V.Y. Kataev, Y. A. Khlopko

TAXONOMIC COMPOSITION OF THE MICROBIOME OF THE HALOTOLERANT STRAIN *CHLOROCOCCUM OLEOFACIENS* TRAINOR & BOLD (CHLOROPHYTA)

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

Objective. To study the diversity of bacteria associated with the halotolerant strain *Chlorococcum oleofaciens* ICIS-Ch1 with high-throughput sequencing.

Materials and methods. The material for the study was total DNA isolated from the microbiome of *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 incubated at different salinity (0, 14 and 50‰). Total DNA was extracted by a combined method, including mechanical homogenization and chemical extraction. DNA libraries were created according to the Illumina 16S Sample Preparation Guide Part # 15044223 Rev. B with primers for the V3-V4 region of the 16S rRNA gene SD-Bact-

0341-bS-17 and SD-Bact-0785-aA-21. Data analysis was carried out using a complex of bioinformatic programs.

Results. The results showed a significant diversity (the number of recorded OTUs reached 50 or more in one sample) and dynamic (depending on the level of salinity and the intensity of growth of the algal culture) of microbiomes associated with *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1. 21 OTUs of associated bacteria that are constantly present in the microbiome of *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 were identified. Most of the bacterial genera found are described as symbionts of freshwater, halotolerant, and halophilic micro- and macroalgae.

Conclusion. For the first time, with the high-throughput sequencing of the variable V3-V4 region of the 16S rRNA gene was determined the composition of microbiome of the halotolerant strain *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 at different salinities. The studied microbiome was characterized by high diversity and included representatives of four phyla: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* and *Planctomycetes*.

Key words: high-throughput sequencing, halotolerance, *Chlorococcum oleofaciens*, microbiome, associated bacteria.

Введение

Развитие водорослей в природных и лабораторных условиях происходит в тесной взаимосвязи с прокариотами [1-5]. Многочисленные исследования аксенических культур показали, что водоросли, лишённые микробиоты, как правило, демонстрируют более слабый рост или фенотипы, отклоняющиеся от типового, по сравнению с неаксеническими культурами. Это свидетельствует о том, насколько ассоциация между бактериями и водорослями важна для существования последних [1, 3].

Установлено, что и водоросли, и бактерии в рамках альго-бактериальной ассоциации влияют на физиологические и метаболические процессы друг друга [3, 5, 6]. В зависимости от факторов среды отмечено как стимулирующее, так и подавляющее влияние [2, 3]. В частности, известно, что водоросли выделяют растворённые органические вещества, тем самым обеспечивая рост ассоциированных с ними бактерий [3]. Помимо стимулирующих веществ, многие виды водорослей способны продуцировать бактерицидные или бактериостатические соединения [7]. Бактерии-ассоцианты аналогичным образом могут либо стимулировать рост макропартнера путем регенерации питательных веществ, выработки микроэлементов и необходимых для роста водоросли витаминов (B1, B7, B12), обогащения микроокружения водоросли углекислым газом и удаления активных форм кислорода, либо, например, в условиях конкуренции за питательные вещества, подавлять рост водоросли [1, 2].

Несмотря на накопленный обширный материал по вопросам взаимо-

действий водорослей и бактерий в альго-бактериальных ассоциациях, исследования в данном направлении не утратили своей актуальности. Это связано с тем, что водоросли сегодня являются перспективным объектом биотехнологий и результаты исследований биологических взаимодействий между микроводорослями и бактериями могут улучшить производство биомассы промышленной культуры [6].

К числу биотехнологически значимых водорослей относится *Chlorococcum oleofaciens* Trainor & Bold (Chlorophyta), обладающий способностью к гиперсинтезу насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, что определяет возможность его использования для производства биотоплива [8, 9]. *Ch. oleofaciens* является одним из наиболее изученных (на физиологическом, ультраструктурном и молекулярном уровне) видов рода *Chlorococcum* [10]. Однако сопутствующая ему бактериофлора ранее не изучалась.

Кроме того, использование современных методов (высокопроизводительное секвенирование) по сравнению с традиционным культуральным подходом позволяет существенно расширить представление о многообразии бактерий, ассоциированных с водорослями [4, 5, 11].

Исходя из вышеизложенного, целью данного исследования явилось изучение разнообразия бактерий-ассоциантов галотолерантного штамма *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 с использованием метода высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы

Характеристика микроводоросли и условий культивирования

Ch. oleofaciens ICIS-Ch1 выделен из воды солоноватой реки Хара (49°14'14.6"N 46°38'51.1"E, соленость 14 ‰), которая впадает в крупнейшее в Европе гипергалинное озеро Эльтон (Биосферный заповедник озеро Эльтон (Lake Elton Biosphere Reserve), Россия, объект Всемирного наследия ЮНЕСКО). Водоросль выделена в чистую культуру путем клонирования единичных клеток микропипеткой с использованием инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ts2 (Nikon, Япония). Идентификация водоросли проведена на основе морфологических признаков и фрагмента гена 18S рРНК (последовательность депонирована в GenBank (NCBI) с регистрационным номером MT921629). Альгологически чистая культура поддерживается на среде Прата (г/л: KNO₃ 0,1; K₂HPO₄ 0,01; MgSO₄×7H₂O 0,01; FeCl₃×6H₂O 0,001) с добавлением в нее хлорида натрия (NaCl) в количестве 14 г/л, в колбах объемом

250 мл, в условиях искусственной инсоляции с фотопериодом 16/8 ч. (день / ночь), при температуре 23-24 °С. Исследуемый штамм *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 обладает широким диапазоном галотолерантности с оптимумом роста при солености 14‰ [12].

Выделение бактериального сообщества Ch. oleofaciens ICIS-Ch1

Для исследования бактериальных сообществ *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 в 30 мл среды Прата с соленостью 0‰ (нижний предел диапазона галотолерантности водоросли), 14‰ (зона оптимального роста водоросли), 50‰ (верхний предел диапазона галотолерантности водоросли) инокулировали 1 мл трехсуточной культуры *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 плотностью $4,7 \pm 0,7$ тыс. кл/мл. В качестве контроля использовали стерильные питательные среды с такой же соленостью без инокулята. Образцы инкубировали в условиях, аналогичных описанным выше. Далее образцы поэтапно фильтровали через два типа мембранных фильтров: с диаметром пор 0,22 мкм и 2,4-4,5 мкм.

Выделение бактериальных сообществ проводили на 10 сутки эксперимента, в фазу экспоненциального роста водорослевой культуры. Эксперимент выполнен дважды в двух повторностях с временным интервалом 4 месяца.

Выделение ДНК

Тотальную ДНК выделяли из фильтров комбинированным методом, включающим механическую гомогенизацию и химическую экстракцию в модификации Бельковой и др. [13]. В каждый образец добавляли лизирующий матрикс E (MP Biomedicals, США) и 400 мкл трис-солевого буфера (20 mM ЭДТА, 750 mM NaCl, 100 mM Трис-HCl, pH 8,0). Образцы гомогенизировали в Tissue Lyser LT (QIAGEN, Германия) в течение 3 мин при 50 Гц. Затем добавляли 50 мкл стерильного литического буфера с лизоцимом (50 мкг/мл) и инкубировали образцы в течение 30 мин при 37°C с последующим добавлением 5 мкл протеиназы K (10 мг/мл) и 10% додецилсульфата натрия до 1% в конечном объеме. Смеси инкубировали в течение 30 мин при температуре 60°C. После экстракции фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом (25:24:1) и хлороформ-изоамиловым спиртом (24:1) ДНК в водной фазе осаждали в течение ночи при температуре -20°C с трехкратным объемом безводного этанола и добавлением 5 M ацетата аммония до 10% от конечного объема. После центрифугирования и двойной промывки 80% этанолом, ДНК высушивали на воздухе и растворяли в автоклавированной воде MQ. Для оценки контаминации при экстракции ДНК отрицательный контроль, содер-

жащий 400 мкл автоклавированной воды MQ, подвергали той же процедуре. Для оценки эффективности метода экстракции ДНК использовали Zymo-BIOMICS Microbial Community Standard (Zymo Research, США). Качество экстрагированной ДНК оценивали с помощью Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, США), определяющего соотношение A260/280, и электрофореза в 1% агарозном геле. Концентрацию ДНК количественно определяли с помощью Qubit 4.0 Fluorometer (Life Technologies, США) с dsDNA High Sensitivity Assay (Life Technologies, США).

Приготовление ДНК-библиотек и высокопроизводительное секвенирование

Библиотеки ДНК были созданы в соответствии с руководством по подготовке образцов Illumina 16S Sample Preparation Guide Part # 15044223 Rev. B (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) с праймерами для области V3-V4 гена 16S рРНК SD-Bact-0341-bS-17 и SD-Bact-0785-aA-21 [14]. Пулированные библиотеки были валидированы и нормализованы с помощью ПЦР в режиме реального времени. Фрагментный анализ ДНК-библиотек выполняли методом капиллярного электрофореза на системе Qiaxcel Advanced system (Qiagen, Германия) с использованием набора QIAXCEL DNA High Resolution Kit. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Miseq (Illumina, США) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit V3 PE600 (Illumina, США).

Биоинформатический анализ

Парно-концевые риды были объединены с минимальным перекрытием 40 bp и значением $P=0,0001$ с использованием PEAR V. 0.9.10 [15]. Удаление адаптеров в объединенных ридах выполнялось с помощью Trimmomatic V. 0.36 [16]. Последующая обработка объединенных ридов проводилась с помощью USEARCH V. 10.0.240 [17] и включала качественную фильтрацию и выбор размера ампликона (минимальный размер 420 bp). Риды длиной менее 420 bp и имеющие ожидаемую ошибку более 1 на 100 нуклеотидов ($\max ee=1.0$) были отфильтрованы. Оценка качества фильтрации проводилась с помощью FastQC v 0.11.7. В результате дерепликации и кластеризации с помощью USEARCH были сформированы операционные таксономические единицы (ОТЕ), а синглтоны и даблтоны были удалены. ОТЕ были сгруппированы с использованием порога сходства 97% между последовательностями для классификации микроорганизмов на видовом уровне. Химерные послед-

довательности были обнаружены и удалены с помощью USEARCH через UCHIME [17]. Контаминирующие ОТЕ были идентифицированы и удалены с помощью команды ublast USEARCH путем сопоставления последовательностей опытных образцов и отрицательных контрольных образцов. Таксономическая классификация последовательностей проводилась с использованием базы данных RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>).

Для последующего анализа из результатов обработки были удалены ОТЕ, соответствующие ДНК хлоропластов, цианобактерий, грибов, а также ОТЕ с низким уровнем сходства с последовательностями в базе данных RDP (ab score <0,7), количеством ридов ≤ 40 и низкой встречаемостью (только в 1 образце).

Необработанные риды депонированы в SRA (NCBI) под номерами: Bioproject number: PRJNA 659386, BioSamples numbers: SAMN15904526 - SAMN15904537 and SAMN15904549 - SAMN15904551.

Результаты и обсуждение

Характеристика галотолерантного штамма Ch. oleofaciens Ch-1

Род *Chlorococcum* (*Chlorococcaceae*, *Chlamydomonadales*, *Chlorophyceae*, *Chlorophyta*) имеет широкое географическое распространение. Его представителей обнаруживают в составе альгоценозов разнотипных почв, пресных водоемов, а также морей от Центральной Азии до Антарктиды [18-20]. Типовым видом является *Chlorococcum infusionum* (Schrank) Meneghini, однако внимание исследователей в большей степени сосредоточено на другом представителе рода – *Chlorococcum oleofaciens* Trainor & Bold (= *Ch. croceum* P.A. Archibald & Bold, *Ch. sphacosum* P.A. Archibald & Bold, *Ch. granulorum* P.A. Archibald). Повышенный интерес к данной водоросли обусловлен ее способностью к гиперсинтезу широкого спектра жирных кислот (в том числе таких, как пальмитиновая, олеиновая, линоленовая, линолевая), а также возможностью ее использования в качестве перспективного ресурса для производства биотоплива [8, 9]. Как и прочие представители рода, *Ch. oleofaciens* широко распространен по всему Земному шару. Типичным местообитанием вида является почва [18, 20], но в литературе приводятся данные и об обнаружении *Ch. oleofaciens* в околородной зоне [21].

Штамм *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 был выделен нами из проб воды солоноватой реки Хара (Биосферный заповедник озеро Эльтон (Lake Elton Biosphere Reserve), Россия, объект Всемирного наследия ЮНЕСКО). Выделен-

ный изолят отличается широким диапазоном галотолерантности – от 0 до 60‰. Зоной оптимального роста водоросли является минерализация 14‰ [12]. При данном уровне солености морфология вегетативных клеток, размеры и способы размножения галотолерантного изолята соответствуют типовому диагнозу, приведенному Trainor and Bold [22], а также описаниям в работах Archibald and Bold [23] и Андреевой [18]. На верхней границе диапазона солеустойчивости (50-60‰) клетки водоросли претерпевают выраженную морфологическую деформацию (утолщение клеточной стенки, сжатие протопласта), приобретают размеры большие, чем установленные в диагнозе, и утрачивают способность к размножению зооспорами [12]. Кроме того, в условиях высокой солености на поверхности водорослевых клеток отмечена адгезия бактерий-ассоциантов (рис. 1).

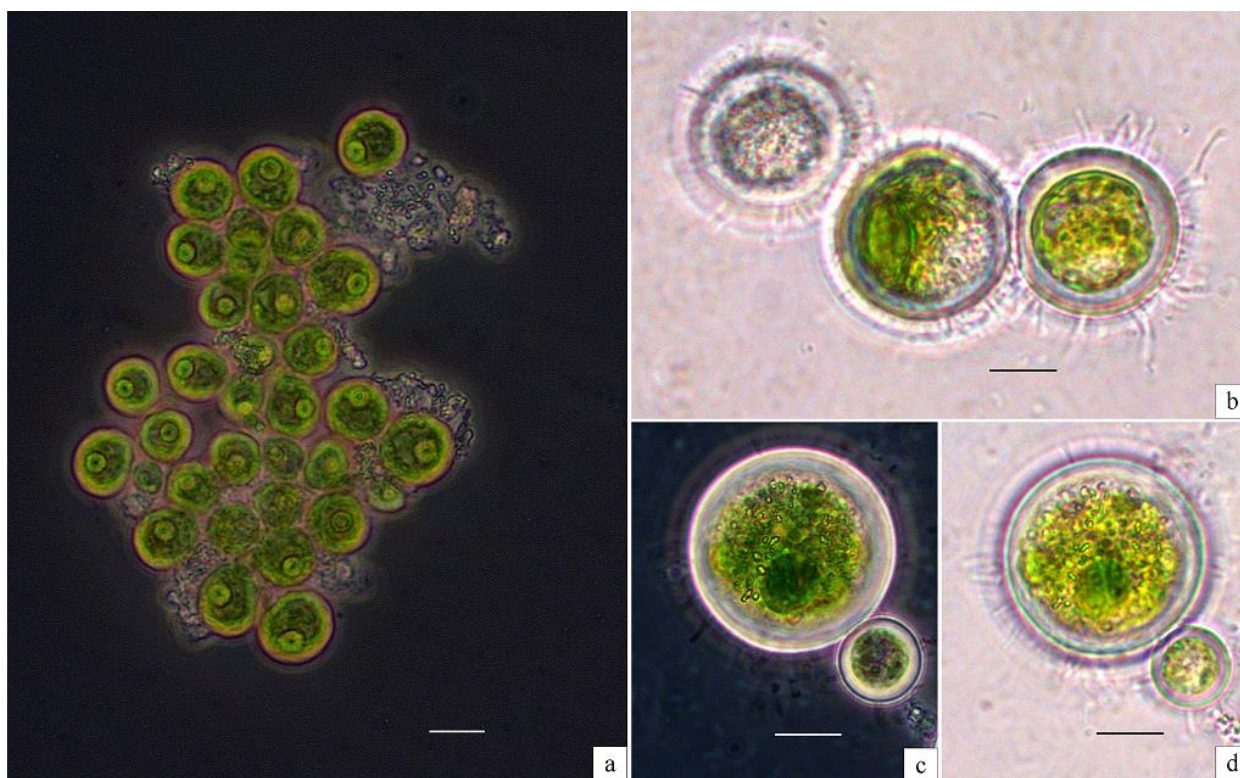


Рис. 1. *Chlorococcum oleofaciens* ICIS-Ch1 (а – водорослевые клетки типичной морфологии и размеров, минерализация 14‰, увеличение 40×, фазово-контрастная микроскопия; b, c, d – водорослевые клетки с утолщенной клеточной стенкой и деформированным протопластом при минерализации 50‰, увеличение 100×, b, d – световая микроскопия, c - фазово-контрастная микроскопия; b, d – на поверхности водорослевой клетки видны адгезированные бактерии палочковидной формы; масштабная линейка - 10 μm).

Поскольку, как отмечено выше, водоросль обладает широким диапазоном солеустойчивости, методом высокопроизводительного секвенирования нами были исследованы микробиомы *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 при разных

уровнях минерализации среды: 0‰ (нижняя граница диапазона галотолерантности), 14‰ (соленость, соответствующая оптимуму роста) и 50‰ (верхняя граница диапазона галотолерантности).

Полученные результаты продемонстрировали значительное разнообразие (количество регистрируемых ОТЕ достигало 50 и более в одном образце) и динамичность (в зависимости от уровня минерализации среды, интенсивности роста водорослевой культуры) микробиома *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1.

Бактерии-ассоцианты галотолерантного штамма Ch. oleofaciens ICIS-Ch1

В целом, большинство обнаруженных прокариот-ассоциантов принадлежали филе *Proteobacteria* (преимущественно *Alphaproteobacteria*), что согласуется с результатами других исследователей, также отмечающих постоянное присутствие, а в ряде случаев и преобладание *Proteobacteria* в составе микробиома водорослей. Такое таксономическое соотношение компонентов микробиома известно, например, у *Cylindrotheca closterium*, *Ettlia* sp. [4], *Tetraselmis suecica* [2], *Cochlodinium polykrikoides* [24], *Asterionellopsis glacialis* и *Nitzschia longissima* [25], *Ectocarpus* sp. [26]. Помимо *Proteobacteria*, в ассоциации с *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 отмечены представители фил *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Planctomycetes*.

На следующем этапе работы среди всего многообразия сопутствующих прокариот были выявлены бактерии-ассоцианты, постоянно присутствующие в составе микробиома *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1. Для этого был использован подход, основанный на оценке встречаемости структурных единиц сообщества, где за постоянные (константные) принимаются ОТЕ, с показателем встречаемости более 80% [27]. Из общего числа зарегистрированных прокариот-ассоциантов указанному выше условию соответствовали 21 ОТЕ (табл.).

Следует отметить, что представители 9 родов были зарегистрированы в микробиоме *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 при всех исследуемых уровнях минерализации - 0‰, 14‰, 50‰ (табл., рис. 2).

Влияние некоторых из них на физиологические реакции и адаптационные возможности макропартнера известны.

Так, например, Lian et al. [3], обобщая литературные данные по влиянию бактерий-ассоциантов на промышленное производство микроводорослей, отмечает стимуляцию *Hyphomonas* sp. ростовых характеристик *Chlorella vulgaris* и *Thalassiosira rotula*.

Таблица. Ближайшие гомологи последовательностей генов 16S рРНК константных бактерий-ассоциантов сообщества *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1

Филогенетическое положение	Бактерии-ассоцианты <i>Ch. oleofaciens</i> Ch-1	Ближайший гомолог в базе данных GenBank (NCBI)	Similarity (%)	Query Cover (%)	Соленость, ‰		
					0	14	50
Proteobacteria Alphaproteobacteria	<i>Pseudoxanthobacter</i> sp.	<i>Pseudoxanthobacter soli</i> (NR_044225.1)	97.73	100	+		+
	<i>Stappia indica</i>	<i>Stappia indica</i> (NR_116431.1)	99.55	100	+	+	+
	<i>Phenylobacterium falsum</i>	<i>Phenylobacterium falsum</i> (NR_042277.1)	99.77	100	+	+	+
	<i>Bauldia</i> sp.	<i>Bauldia consociata</i> (NR_044600.1)	97.74	100	+	+	
	<i>Hyphomonas polymorpha</i>	<i>Hyphomonas polymorpha</i> (NR_025325.1)	99.55	100	+	+	+
	<i>Hoeflea</i> sp.	<i>Hoeflea olei</i> (NR_136771.1)	98.64	100	+	+	+
	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i> (NR_074262.1)	98.86	100	+	+	
	<i>Mesorhizobium sediminum</i>	<i>Mesorhizobium sediminum</i> (NR_152716.1)	99.55	100	+		+
	<i>Mesorhizobium</i> sp.	<i>Mesorhizobium carbonis</i> (NR_164961.1)	97.50	100	+	+	
	<i>Devosia</i> sp.	<i>Devosia marina</i> (NR_170430.1)	100	100	+	+	+
	<i>Salinarimonas ramus</i>	<i>Salinarimonas ramus</i> (NR_108683.1)	99.32	100			+
	<i>Oceanibaculum nanhaiense</i>	<i>Oceanibaculum nanhaiense</i> (NR_159190.1)	100	100		+	+
Proteobacteria Beta-proteobacteria	<i>Limnobacter thiooxidans</i>	<i>Limnobacter thiooxidans</i> (NR_025421.1)	99.78	100	+	+	+
Proteobacteria Gamma-proteobacteria	<i>Aquimonas voraii</i>	<i>Aquimonas voraii</i> (NR_042968.1)	99.14	100	+	+	+
Bacteroidetes	<i>Flaviumibacter cheonanensis</i>	<i>Flaviumibacter cheonanensis</i> (NR_134031.1)	99.57	100	+		
	<i>Algoriphagus aquaeductus</i>	<i>Algoriphagus aquaeductus</i> (NR_116214.1)	100	100	+	+	+
	UI Bacteroidetes	<i>Chryseolinea soli</i> (NR_165708.1)	90.85	100	+	+	+
Actinobacteria	<i>Mycolicibacterium</i> sp.	<i>Mycolicibacterium frederiksbergense</i> (NR_025393.1)	99.78	100	+		
	UI Actinobacteria	<i>Aciditerrimonas ferrireducens</i> (NR_112972.1)	92.76	100		+	
	UI Actinobacteria	<i>Gaiella occulta</i> (NR_118138.1)	89.06	100			+
Planctomycetes	UI Planctomycetes	<i>Bythopirellula goksoyri</i> (NR_118636.1)	91.72	100	+		

Примечание: UI (unidentified member of certain taxon) – неидентифицированный представитель определенного таксона.

Представители рода *Mesorhizobium* являются ассоциантами многих водорослей, среди которых *Lobomonas rostrate* [3, 6], *Chlamydomonas nivalis* [6], *Asterionellopsis glacialis* [25], *Tetrasselmis suecica*, *Chlorella*, *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Pseudonitzschia*, *Pavlova* [2]. Согласно данным выше указанных ав-

торов *Mesorhizobium* обеспечивает водоросли необходимым для их жизнедеятельности витамином B12.

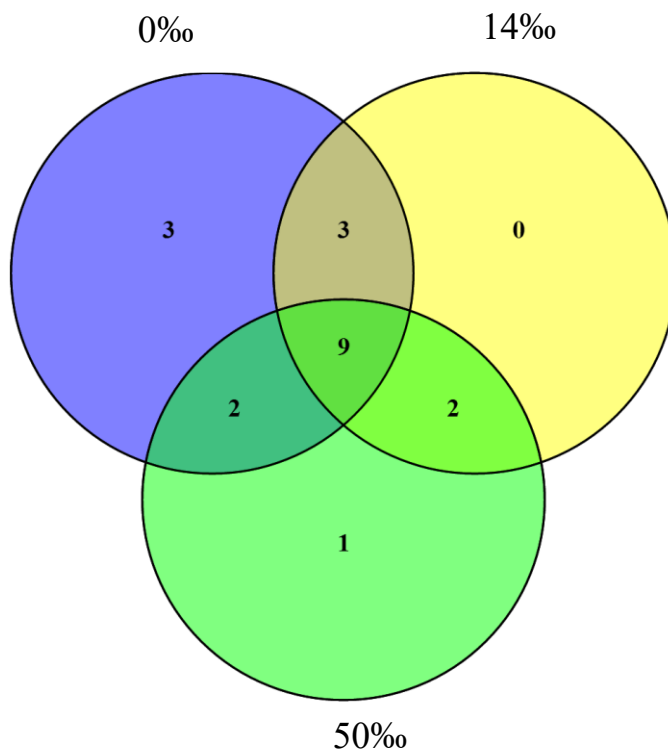


Рис. 2. Диаграмма Венна, отражающая общие и специфические таксоны бактерий, обнаруженные в ассоциации с *Chlorococcum oleofaciens* ICIS-Ch1 при разном уровне минерализации среды.

Бактерии рода *Stappia* регистрируют в числе ассоциантов водорослей родов *Nannochloropsis*, *Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Chaetoceros*, *Pseudonitzschia* [2], *Ectocarpus* [26]. В составе микробиома бурой водоросли *Ectocarpus* также отмечены представители родов *Devosia* и *Limnobacter* [26]. На примере *Ectocarpus* sp. авторами показано, что ассоциативные микробные сообщества, включающие *Stappia*, *Devosia* и *Limnobacter*, влияют на физиологические реакции и адаптационные возможности *Ectocarpus* sp., позволяя водоросли выживать как в пресной, так и соленой воде [26].

Учитывая описанное выше стимулирующее влияние этих бактерий, а также их обнаружение в составе микробиома *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1 при всех исследуемых уровнях солености (0‰, 14‰, 50‰), можно выдвинуть предположение об участии указанных ассоциантов в адаптации водоросли к осмотическому стрессу. В то же время необходимо проведение более детальных исследований с целью определения функциональной роли бактерий, ас-

социированных с *Ch. oleofaciens* ICIS-Ch1.

Заключение

Таким образом, впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования переменного участка V3-V4 гена 16S рНК определен состав микробиома галотолерантного штамма *Chlorococcum oleofaciens* ICIS-Ch1 при разных уровнях минерализации. Исследуемые микробиомы характеризовались высоким разнообразием и включали представителей четырех фил: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Planctomycetes*. Большинство обнаруженных родов бактерий известны как ассоцианты пресноводных, галотолерантных и галофильных микро- и макроскопических водорослей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tapia J.E., González B., Goulitquer S., Potin P., Correa J.A. Microbiota Influences Morphology and Reproduction of the Brown Alga *Ectocarpus* sp. *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7: 197. doi: 10.3389/fmicb.2016.00197
2. Biondi N., Cheloni G., Tatti E., Decorosi F., Rodolfi L., Giovannetti L., Viti C., Tredici M.R. The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. *Journal of Applied Phycology*. 2017. 29: 67–78. DOI 10.1007/s10811-016-0966-5
3. Lian J., Wijffels R.H., Smidt H., Sipkema D. The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microbial Biotechnology*. 2018. 11(5): 806–818. doi:10.1111/1751-7915.13296
4. Vu C.H.T., Chun S.-J., Seo S.-H., Cui Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M. Bacterial community enhances flocculation efficiency of *Ettlia* sp. by altering extracellular polymeric substances profile. *Bioresource Technology*. 2019. 281: 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.062>
5. Sandhya S.V., Vijayan K.K. Symbiotic association among marine microalgae and bacterial flora: a study with special reference to commercially important *Isochrysis galbana* culture. *Journal of Applied Phycology*. 2019. 31: 2259–2266. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01772-2>
6. Yao S., Lyu S., An Y., Lu J., Gjermansen C., Schramm A. Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2018. 126: 359–368. doi:10.1111/jam.14095
7. Tredici M.R., Biondi N., Ponis E., Rodolfi L., Chini Zittelli, G. Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management*. 2009. Burnell G., Allan G. (eds). Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 610–676.
8. Del Río E., Armendáriz A., García-Gómez E., García-González M., Guerrero M.G. Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. *Journal of Biotechnology*. 2015. 195: 103–107. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.024
9. Del Río E., García-Gómez E., Moreno J., Guerrero M.G., García-González M. Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Algal Research*. 2017. 23: 37–42. doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.003
10. Kawasaki Y., Nakada T., Tomita M. Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (Volvocales, Chlorophyceae), and its relatives. *Journal of Phycology*. 2015. 51:1000–1016. <http://doi.org/10.1111/jpy.12343>
11. Goecke F., Thiel V., Wiese J., Labes A., Imhoff J.F. Algae as an important environment for

- bacteria – phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia*. 2013. 52:14–24. <https://doi.org/10.2216/12-24.1>
12. Ignatenko M.E., Yatsenko-Stepanova T.N., Khlopko Y.A. Halotolerant strain of *Chlorococcum oleofaciens* from the Lake Elton Biosphere Reserve, *Biosystems Diversity*. 2019. 27(3): 244–249. doi:10.15421/011934
 13. Bel'kova N.L., Dzyuba E.V., Sukhanova E.V., Khanaeva T.A. Adaptation of molecular genetic methods to study microorganisms associated with fish. *Inland Water Biology*. 2008. 1(2): 192–195.
 14. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013. 41(1). e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
 15. Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger. *Bioinformatics*. 2014. 30(5): 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
 16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014. 30(15): 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
 17. Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*. 2013. 10: 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
 18. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли. Санкт-Петербург: Наука, 1998. 348 с.
 19. Novis P.M., Aislabie J., Turner S., McLeod M. Chlorophyta, Xanthophyceae and Cyanobacteria in Wright Valley, Antarctica. *Antarctic Science*. 2015. 5(27): 439–454. doi:10.1017/S0954102015000164
 20. Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org/>; searched on 25 December 2020.
 21. Михайлюк Т., Виноградова О., Глайзер К., Демченко Е., Карстен У. Разнообразие наземных водорослей мыса Казантип (Крым, Украина) и некоторые вопросы их филогении и экологии. *Альгология*. 2018. 28(4): 363–386. doi.org/10.15407/alg28.04.363
 22. Trainor F.R., Bold H.C. Three new unicellular Chlorophyceae from soil. *American Journal of Botany*. 1953. 40: 758–767.
 23. Archibald P.A., Bold H.C. The genus *Chlorococcum* Meneghini. *Phycological Studies*. 1970. 11: 1–115.
 24. Shin H.S., Lee E., Shin J., Ko S.-R., Oh H.-S., Ahn C.-Y., Oh H.-M., Cho B.-K., Cho S. Elucidation of the bacterial communities associated with the harmful microalgae *Alexandrium tamarense* and *Cochlodinium polykrikoides* using nanopore sequencing. *Scientific Reports*. 2018. 8: 5323. DOI:10.1038/s41598-018-23634-6
 25. Behringer G., Ochsenkühn M.A., Fei C., Fanning J., Koester J.A., Amin S.A. Bacterial communities of diatoms display strong conservation across strains and time. *Frontiers in Microbiology*. 2018. 9: 659. doi: 10.3389/fmicb.2018.00659
 26. Dittami S.M., Duboscq-Bidot L., Perennou M., Gobet A., Corre E., Boyen C., Tonon T. Host–microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *International Society for Microbial Ecology*. 2016. 10: 51–63. doi:10.1038/ismej.2015.104
 27. Баканов А.И. Количественная оценка доминирования в экологических сообществах. В: Количественные методы экологии и гидробиологии. Розенберг Г.С. (ред.). Тольятти: СамНЦ РАН, 2005: 37–67.

Поступила 30.12.2020

(Контактная информация: **Игнатенко Марина Евгеньевна** – к.б.н., старший научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Орен-

REFERENCES

1. Tapia J.E., González B., Goulitquer S., Potin P., Correa J.A. Microbiota Influences Morphology and Reproduction of the Brown Alga *Ectocarpus* sp. *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7: 197. doi: 10.3389/fmicb.2016.00197
2. Biondi N., Cheloni G., Tatti E., Decorosi F., Rodolfi L., Giovannetti L., Viti C., Tredici M.R. The bacterial community associated with *Tetraselmis suecica* outdoor mass cultures. *Journal of Applied Phycology*. 2017. 29: 67–78. DOI 10.1007/s10811-016-0966-5
3. Lian J., Wijffels R.H., Smidt H., Sipkema D. The effect of the algal microbiome on industrial production of microalgae. *Microbial Biotechnology*. 2018. 11(5): 806–818. doi:10.1111/1751-7915.13296
4. Vu C.H.T., Chun S.-J., Seo S.-H., Cui Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M. Bacterial community enhances flocculation efficiency of *Ettlia* sp. by altering extracellular polymeric substances profile. *Bioresource Technology*. 2019. 281: 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.062>
5. Sandhya S.V., Vijayan K.K. Symbiotic association among marine microalgae and bacterial flora: a study with special reference to commercially important *Isochrysis galbana* culture. *Journal of Applied Phycology*. 2019. 31: 2259–2266. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01772-2>
6. Yao S., Lyu S., An Y., Lu J., Gjermansen C. Schramm A. Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review. *Journal of Applied Microbiology*. 2018. 126: 359–368. doi:10.1111/jam.14095
7. Tredici M.R., Biondi N., Ponis E., Rodolfi L., Chini Zittelli, G. Advances in microalgal culture for aquaculture feed and other uses. In *New Technologies in Aquaculture: Improving Production Efficiency, Quality and Environmental Management*. 2009. Burnell G., Allan G. (eds). Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 610–676.
8. Del Río E., Armendáriz A., García-Gómez E., García-González M., Guerrero M.G. Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil. *Journal of Biotechnology*. 2015. 195: 103–107. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.024
9. Del Río E., García-Gómez E., Moreno J., Guerrero M.G., García-González M. Microalgae for oil. Assessment of fatty acid productivity in continuous culture by two high-yield strains *Chlorococcum oleofaciens* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Algal Research*. 2017. 23: 37–42. doi.org/10.1016/j.algal.2017.01.003
10. Kawasaki Y., Nakada T., Tomita M. Taxonomic revision of oil-producing green algae, *Chlorococcum oleofaciens* (Volvocales, Chlorophyceae), and its relatives. *Journal of Phycology*. 2015. 51:1000–1016. <http://doi.org/10.1111/jpy.12343>
11. Goecke F., Thiel V., Wiese J., Labes A., Imhoff J.F. Algae as an important environment for bacteria – phylogenetic relationships among new bacterial species isolated from algae. *Phycologia*. 2013. 52:14–24. <https://doi.org/10.2216/12-24.1>
12. Ignatenko M.E., Yatsenko-Stepanova T.N., Khlopko Y.A. Halotolerant strain of *Chlorococcum oleofaciens* from the Lake Elton Biosphere Reserve, *Biosystems Diversity*. 2019. 27(3): 244–249. doi:10.15421/011934
13. Bel’kova N.L., Dzyuba E.V., Sukhanova E.V., Khanaeva T.A. Adaptation of molecular genetic methods to study microorganisms associated with fish. *Inland Water Biology*. 2008. 1(2): 192–195.
14. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 2013. 41(1). e1.

- <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
15. Zhang J., Kobert K., Flouri T., Stamatakis A. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd merger. *Bioinformatics*. 2014. 30(5): 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
 16. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014. 30(15): 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
 17. Edgar R.C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*. 2013. 10: 996–998. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2604>
 18. Andreyeva V.M. Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). Saint-Petersburg: Nauka, 1998. 348 p. (in Russian)
 19. Novis P.M., Aislabie J., Turner S., McLeod M. Chlorophyta, Xanthophyceae and Cyanobacteria in Wright Valley, Antarctica. *Antarctic Science*. 2015. 5(27): 439–454. doi:10.1017/S0954102015000164
 20. Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 25 December 2020.
 21. Mikhailyuk T., Vinogradova O., Glaser K., Demchenko E., Karsten U. Diversity of terrestrial algae of cape Kazantip (the sea of Azov, Ukraine) and some remarks on their phylogeny and ecology. *Algologia*. 2018. 28(4): 363–386. (in Russian). doi.org/10.15407/alg28.04.363
 22. Trainor F.R., Bold H.C. Three new unicellular Chlorophyceae from soil. *American Journal of Botany*. 1953. 40: 758–767.
 23. Archibald P.A., Bold H.C. The genus *Chlorococcum* Meneghini. *Phycological Studies*. 1970. 11: 1–115.
 24. Shin H.S., Lee E., Shin J., Ko S.-R., Oh H.-S., Ahn C.-Y., Oh H.-M., Cho B.-K., Cho S. Elucidation of the bacterial communities associated with the harmful microalgae *Alexandrium tamarense* and *Cochlodinium polykrikoides* using nanopore sequencing. *Scientific Reports*. 2018. 8: 5323. DOI:10.1038/s41598-018-23634-6
 25. Behringer G., Ochsenkühn M.A., Fei C., Fanning J., Koester J.A., Amin S.A. Bacterial communities of diatoms display strong conservation across strains and time. *Frontiers in Microbiology*. 2018. 9: 659. doi: 10.3389/fmicb.2018.00659
 26. Dittami S.M., Duboscq-Bidot L., Perennou M., Gobet A., Corre E., Boyen C., Tonon T. Host–microbe interactions as a driver of acclimation to salinity gradients in brown algal cultures. *International Society for Microbial Ecology*. 2016. 10: 51–63. doi:10.1038/ismej.2015.104
 27. Bakanov A.I. Quantitative assessment of dominance in ecological communities. In: Quantitative methods of ecology and Hydrobiology. Rosenberg G.S. (ed.). 2005. Togliatti. P. 37–67. (in Russian).

Образец ссылки на статью:

Игнатенко М.Е., Яценко-Степанова Т.Н., Катаев В.Я., Хлопко Ю.А. Таксономический состав микробиома галотолерантного штамма *Chlorococcum oleofaciens* Trainor & Bold (Chlorophyta). Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2020. 4. 14с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2020-4/Articles/MEI-2020-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2020-14001