

Филогенетическое разнообразие бактерий на различных глубинах Южного Байкала, выявленное по последовательностям 16S рРНК

Л. Я. ДЕНИСОВА, Н. Л. БЕЛЬКОВА, И. И. ТУЛОХОНОВ, Е. Ф. ЗАЙЧИКОВ

*Лимнологический институт СО РАН
664033 Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3*

АННОТАЦИЯ

На основе данных по последовательностям 16S рРНК проведен систематический и сравнительный филогенетический анализ бактерий, обитающих на различных глубинах Южной котловины оз. Байкал. Показано, что состав бактериопланктона на различных глубинах существенно различается. В поверхностном и придонном слоях преобладают цианобактерии. На средних глубинах (400 м) основную долю составляют родственники актиномицетов. Глубинные слои представлены главным образом протеобактериями. Большая часть выявленных бактериальных последовательностей имеет очень низкое сходство с известными. На филогенетическом дереве такие последовательности образуют отдельные кластеры, что, возможно, указывает на эндемичную природу соответствующих бактерий.

Озеро Байкал – крупнейший и наиболее глубокий пресноводный водоем, видообразование в котором происходило в течение приблизительно 20 млн лет в уникальных экологических условиях (наибольшие в мире глубины пресной воды, постоянно низкие температуры и т. д.). Бактериальные сообщества представляют собой очень важную часть экосистемы озера. Микробиологические исследования ведутся на Байкале давно. Исследуются различные физиологические группы бактерий, их общая численность и биомасса, сезонная динамика и вертикальное распределение бактерий [1–3]. Однако изучение видового состава микроорганизмов ограничивалось культивируемыми видами. В последнее время появились подходы, основанные на анализе первичной структуры нуклеиновых кислот, содержащихся в природных образцах, что помогает составить

более адекватное представление о видовом разнообразии присутствующих микроорганизмов. Число исследований микробиологического разнообразия природных сообществ с помощью таких филогенетических подходов постоянно возрастает [4–10]. Недавно нами опубликованы первые данные о генетическом биоразнообразии глубоководных бактерий Южной котловины оз. Байкал [11].

В рамках данной работы на основе анализа последовательностей 16S рибосомальной РНК впервые проведен систематический и сравнительный филогенетический анализ пресноводных бактерий. Показано, что видовой состав бактерий, обитающих на разных глубинах, существенно различается. Многие бактерии не имеют близких аналогов по последовательности среди известных в банке данных и поэтому, возможно, относятся к эндемичной популяции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб воды. Пробы воды были взяты 6 сентября 1996 г. с глубин 25, 400, 1200 и 1400 м в Южной котловине озера (разрез Листвянка – Танхой, N 53° 12' 58", E 105° 01' 54", максимальная глубина 1430 м). По 3 л воды было отфильтровано через нитроцеллюлозный фильтр (Millipore, HAWP 0,22 мк). Бактериальный материал смывали в буфере 10 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0,1М NaCl, 2мМ ЭДТА, центрифугировали, надосадочную жидкость сливали, а осадок хранили в холодильнике до выделения ДНК.

Выделение ДНК. Выделение хромосомной ДНК проводили с помощью набора для выделения ДНК QIAamp Blood&tissue (QIAGEN, США) по прилагаемой к набору инструкции.

Праймеры, использованные в работе. В работе были использованы следующие праймеры, комплементарные участкам гена 16S рРНК бактерий:

500L – CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
800L – AGGATTAGATACCCTGGTAGTC
1000L – GATGCAACGCGAAGAACCTTACC
1000R – CCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGC
1230R – CATGTAGCTCGTGTGTAGCCC
1350R – GACGGGCGGTGTGTACAAG

Праймеры, комплементарные участкам плазмиды рАТ123:

M13-UP – GGA AACAGCTATGACCAT
M13-DOWN – GTAAAACGACGGCCAGTG

Аmplификация фрагмента ДНК, соответствующего гену 16S рРНК. Участок гена 16S рРНК амплифицировали, используя олигонуклеотидные праймеры 500L и 1350R, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК эубактерий в районах нуклеотидов 500 и 1350 (по *Escherichia coli*). Амплификацию проводили в режиме, обеспечивающем наибольшее "представительство" разнообразных последовательностей.

Клонирование PCR-продуктов и анализ клонов. Для клонирования PCR-продуктов, содержащих фрагмент гена 16S рРНК, использовалась плазида рАТ123 (ClonTech). Лигирование и трансформацию проводили по стандартным методикам [12]. Отбор клонов проводился методом "бело-голубого" скрининга. Колонии проверяли на наличие полной вставки амплификацией грубого лизата колоний на

праймерах, комплементарных вектору рАТ123 (M13-UP и M13-DOWN). Продукты амплификации анализировали в агарозном фореze, фрагменты нужной длины вырезали и элюировали.

Секвенирование фрагмента гена 16S РНК.

С элюатов PCR-продуктов получены продукты с праймерами 500L и 1000R. Реакцию секвенирования проводили, используя набор для секвенирования PCR cyclist фирмы "STRATAGENE" (США), по прилагаемой к набору инструкции. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 7 % полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины, и визуализировали авторадиографией. На первом этапе проводили секвенирование фрагментов с использованием одного терминирующего ddNTP, картины "однобуквенных сиквенсов" сравнивали. Клоны, различающиеся по картинам "однобуквенных сиквенсов", секвенировали с использованием заливок 500L и 1000R. Для определения нуклеотидной последовательности всего участка вставки с исходного PCR-фрагмента дополнительно получали субфрагменты, соответствующие участкам между положениями 800 и 1230, а также 1000 и 1350, последовательности которых определяли с помощью праймеров 800L, 1230R, 1000L и 1350R. Последовательности полноразмерных вставок отправлены в EMBL-банк данных, и им присвоены следующие номера AJ007657, AJ007656, AJ007648, AJ007647, AJ007646, AJ007645, AJ007642, AJ007641, AJ007640, AJ007639, AJ222835.

Анализ полученных последовательностей проводили путем сравнения с последователь-

Распределение байкальских бактерий по филогенетическим группам

Группа бактерий	Глубина, м				Всего
	25	400	1200	1400	
Цианобактерии	17	–	–	16	33
α-Протеобактерии	–	4	12	4	20
β-Протеобактерии	1	–	–	–	1
γ-Протеобактерии	–	3	3	–	6
δ-Протеобактерии	–	–	4	–	4
Актиномицеты	2	17	8	1	28
Планктомицеты	–	–	3	1	4
Голофаги	–	–	2	–	2
Нитроспира	–	–	1	1	2
Всего	20	24	33	23	100

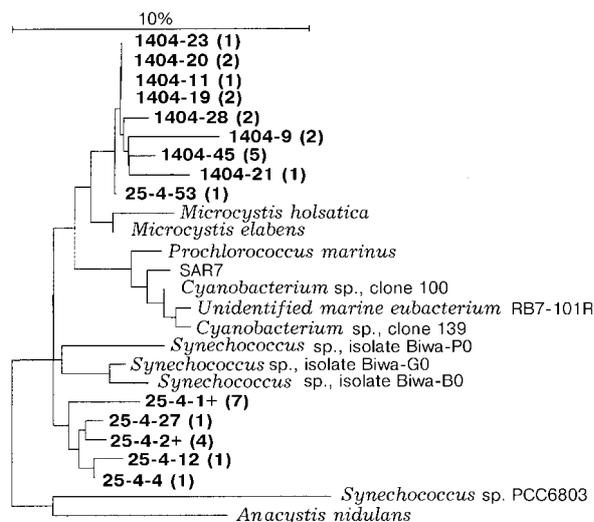


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное для представителей цианобактерий. Дерево построено на основе 16S-последовательностей, гомологичных последовательностям цианобактерий. В дерево включены также цианобактерии EMBL-банка, имеющие наибольшее генетическое сходство с байкальскими. Клоны байкальских бактерий, выявленные в данной работе, выделены жирным шрифтом.

ностями EMBL-банка. Использовали пакет программ FASTA. Для построения эволюционных деревьев использовали последовательности между координатами 528 и 930 (по *E. coli*) за исключением гипервариабельного участка 810–825. Деревья строили с помощью пакета программ TreeConW (Van de Peer) [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проанализированы 4 пробы воды с глубин 25, 400, 1200 и 1400 м. Выделена суммарная ДНК, продукты амплификации этой ДНК, полученные с помощью высококонсервативных бактериальных праймеров, клонировали. Определили нуклеотидные последовательности вставок, содержащих фрагмент гена 16S рРНК с координатами 500–1000. Всего для 100 проанализированных клонов получено 60 различных последовательностей. Для каждой последовательности проведен поиск наиболее сходных последовательностей в EMBL-банке данных. За единичными исключениями не найдено ни одной идентичной последовательности. Подавляющее большинство бактерий, выявленных в данной работе по последовательностям 16S рРНК, не обнаружены в Байкале методом

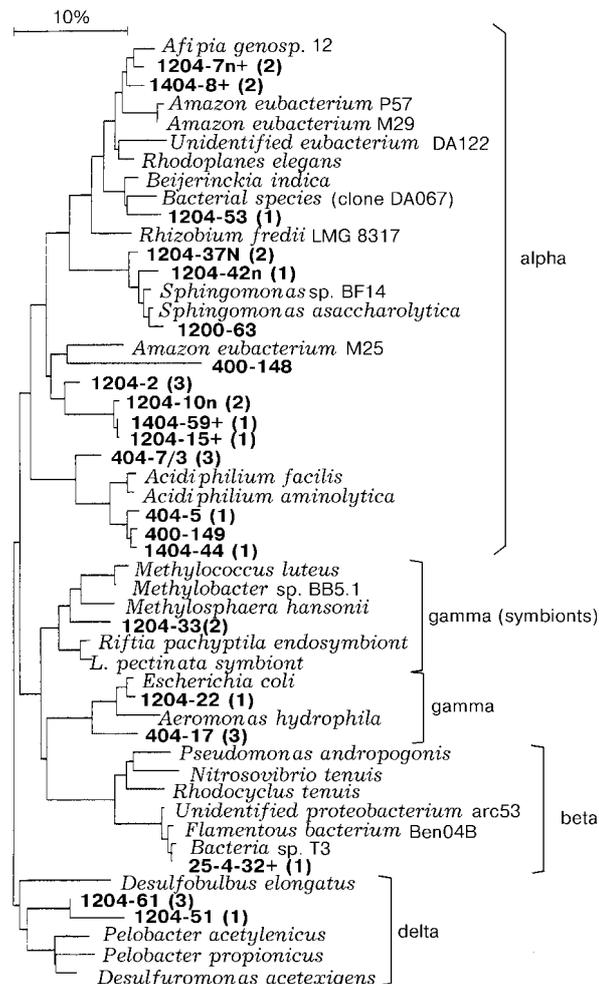


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для представителей протеобактерий. Дерево построено на основе 16S-последовательностей, гомологичных последовательностям протеобактерий. В дерево включены протеобактерии EMBL-банка, имеющие наибольшее генетическое сходство с байкальскими.

культивирования. Значительное отличие состава культивируемых бактерий от состава бактерий, определенных по суммарной ДНК, указывает на незначительную долю культивируемых бактерий во всей популяции. Большая часть генетических родственников байкальских бактерий также является некультивируемыми видами, выявленными только по последовательностям ДНК. Как следует из сравнительного анализа результатов (см. таблицу), состав бактериопланктона на разных глубинах Южной котловины оз. Байкал существенно различается. Согласно последовательностям 16S рРНК, бактерии, обнаруженные на Южном Байкале, в ос-

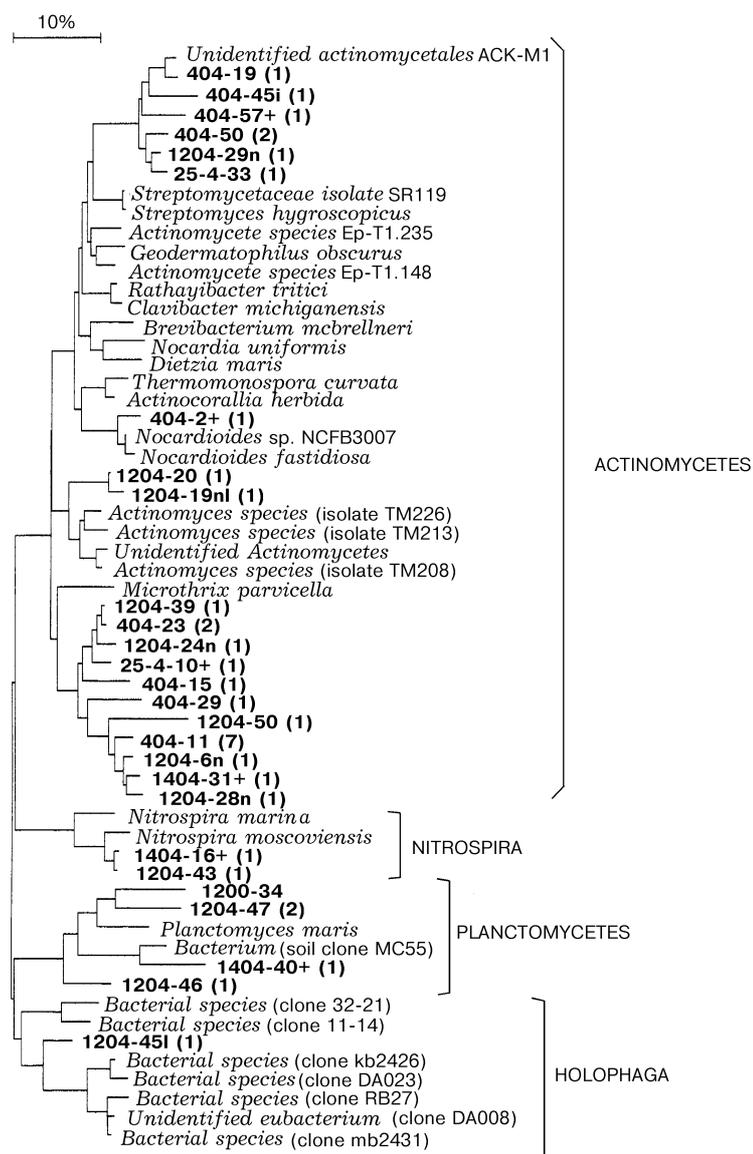


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное для представителей следующих филогенетических классов: актиномицеты, голофаги, планктомицеты и группы нитроспира. Дерево построено на основе определенных в настоящей работе последовательностей 16S рРНК, гомологичных последовательностям представителей этих классов, а также их ближайших генетических родственников.

новном представлены циано- и протеобактериями, а также актиномицетами.

Цианобактерии доминируют на глубинах 25 и 1400 м (см. таблицу). Наличие их в поверхностном слое согласуется с ежегодным цианобактериальным цветением воды, наблюдавшимся и летом 1996 г., а также с данными многолетних исследований бактерио- и пикопланктона поверхностного слоя оз. Байкал [14–15], в том числе и по 16S рРНК [16]. Филогенетический анализ последовательностей указывает на то, что цианобактерии, выявленные в поверх-

ностной пробе, очень однородны. На филогенетическом дереве (рис. 1) они образуют компактный кластер, примыкающий к цианобактериям рода *Synechococcus*, найденным в японском оз. Бива [8]. Наличие же большого числа цианобактериальных последовательностей в придонном слое несколько неожиданно. Вопрос о том, представляют ли эти цианобактерии отдельное экосообщество или занесены из верхнего слоя водными потоками (процесс опускания и движения которых, согласно гидрологическим данным, происходит вдоль подводного

склона озера [17]), будет предметом дальнейших исследований. Следует отметить, что последовательности, обнаруженные на глубине 1400 м, хотя и сходны с цианобактериальными, выявленными в поверхностной пробе, образуют отдельный кластер на филогенетическом дереве (см. рис. 1).

Протеобактерии составляют значительную долю популяции байкальских бактерий (31 клон, см. таблицу). Наибольшее их количество обнаружено на глубине 1200 м (19 клонов). Согласно филогенетическому анализу (рис. 2), большинство байкальских протеобактерий (20 клонов) относятся к подгруппе альфа. На филогенетическом дереве можно отметить несколько изолированных, хотя и менее выражено, чем в случае цианобактерий, кластеров байкальских последовательностей (1404–44, 1204–2, 1204–61). Многие из обнаруженных протеобактерий имеют близких по последовательности некультивируемых родственников из других природных экосистем (например, почв у р. Амазонки [18]).

Актиномицетоподобные бактерии, выявленные в основном на глубине 400 м, имеют очень низкую степень сходства последовательностей с уже известными последовательностями (как правило, 85–90 %). На филогенетическом дереве они образуют два хорошо выраженных кластера, примыкающих к актиномицетам (рис. 3). Один из этих кластеров включает в себя некультивируемый актиномицет АСК–М1, выявленный такими же методами из горных озер (штат Нью-Йорк, США) [7]. Другой кластер примыкает к актиномицету *Microthrix parvicella*, определенному как генетически отдаленный от известных на то время актиномицетов (1994 г.) [19]. Возможно, соответствующие актиномицетоподобные байкальские бактерии относятся к двум неизвестным до сих пор филогенетическим группам. Высокое представительство актиномицетов на глубине 400 м, возможно, объясняется повышенным содержанием органических веществ на этой глубине.

Помимо основного числа последовательностей, соответствующих трем филогенетическим группам, рассмотренным выше (цианобактерии, протеобактерии и актиномицеты), в глубинных слоях Южного Байкала обнаружены последовательности, генетически родственные планктомицетам (4 клона), а также представи-

телям филогенетически обособленных кластеров *Nitrospira* и *Holophaga* (по 2 клона) (см. рис. 3). Планктомицеты – генетические родственники байкальских клонов – являются водными или почвенными организмами. Кластер *Nitrospira* пока представлен в банке последовательностей только двумя водными видами [20]. Недавно выделенные в отдельный филум голофаги [21] в основном представлены некультивируемыми видами, обнаруженными в пресной воде и почве.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Верхозина, в кн.: Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1985, 33–42.
2. В. В. Парфенова, в кн.: Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1985, 55–64.
3. В. В. Дрюккер, А. И. Штевнева, в кн. Путь познания Байкала, Новосибирск, Наука, Сиб. отд-ние, 1987, 156–163.
4. S. J. Giovannoni, T. B. Britschgi, C. L. Moyer, K. G. Field, *Nature*, 1990, 345, 60–63.
5. D. A. Stahl, R. Key, B. Flesher, J. Smit, *J. Bacteriol.*, 1992, 174, 2193–2198.
6. J. A. Fuhrman, K. McCallum, A. A. Davis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 1294–1302.
7. W. D. Hiorns, B. A. Methe, S. A. Nierzwicki-Bauer, J. P. Zehr, *Ibid.*, 1997, 63, 2957–2960.
8. M. Kane, H. Maeda, T. Fukunaga, K. Nishi, *J. Mar. Biotechnol.*, 1997, 5, 41–45.
9. H. Takmai, A. Inoue, F. Fuji, K. Horikoshi, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 152, 279–285.
10. M. G. Wise, J. V. McArthur, L. J. Shimkets, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 1505–1514.
11. Н. Л. Белькова, Л. Я. Денисова, Е. Н. Манакова и др., *ДАН*, 1996, 348, 692–695.
12. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, V. 2.
13. Y. Van de Peer, R. De Wachter, *Comput. Applic. Biosci.*, 1994, 10, 569–570.
14. Н. А. Бондаренко, Н. Е. Гусельникова, *Биол. науки. Гидробиология*, 1989, 17, 34–36.
15. T. Nagata, K. Takai, K. Kawanobe, et al., *J. Plankton Res.*, 1994, 16, 945–959.
16. Е. А. Семенова, К. Д. Кузнецов, *Молек. биология*, 1998, 32.
17. М. Н. Шимараев, В. В. Парфенова, Т. Я. Косторнова, Байкал – природная лаборатория для исследования изменений окружающей среды и климата. Тез. докл. 11–17 мая 1994 г., Иркутск.
18. J. Borneman, E. W. Triplett, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 2647–2653.
19. L. L. Blackall, E. M. Seviour, M. A. Cunningham, et al., *Syst. Appl. Microbiol.*, 1994, 17, 513–518.
20. S. Ehrich, D. Behrens, H. Lebedeva, et al., *Arch. Microbiol.*, 1995, 164, 16–23.
21. W. Ludwig, S. H. Bauer, M. Bauer, et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, 153, 181–190.

Phylogenetic Diversity of Bacteria at Various Depths of the South Baikal as Detected by 16S rRNA Sequences

L. Ya. DENISOVA, N. L. BELKOVA, I. I. TULOKHONOV, E. F. ZAICHIKOV

On the basis of data on 16S rRNA sequences, a systematic and comparative phylogenetic analysis of bacteria inhabiting various depths of the southern hollow of Lake Baikal was carried out. It is demonstrated that the composition of bacterioplankton at various depths is considerably different. In the superficial and in the benthal layers, cyanobacteria prevail. At middle depths (400 m) the bulk is composed of actinomycetes' relatives. The deep layers are represented mainly by proteobacteria. The major part of the detected bacterial sequences have a very low similarity to the known ones. On the phylogenetic tree, such sequences form separate clusters, which possibly points to endemic nature of respective bacteria.