

Ковалева Ольга Леонидовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОВ
РУБИСКО И АТФ-ЗАВИСИМОЙ ЦИТРАТЛИАЗЫ
У ФОТО- И ХЕМОАВТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
И АНАЛИЗ ИХ РАЗНООБРАЗИЯ
В ОСАДКАХ СОЛЁНЫХ И СОДОВЫХ ОЗЁР**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2010 г.

Работа выполнена в Институте микробиологии имени С.Н. Виноградского РАН
(Лаборатория экологии и геохимической деятельности микроорганизмов)

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
Ивановский Руслан Николаевич

доктор биологических наук

Турова Татьяна Павловна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Игнатов Александр Николаевич

кандидат биологических наук

Черных Николай Алексеевич

Ведущая организация

**Институт биохимии и
физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина РАН, г.Пущино**

Защита состоится 14 декабря 2010 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан __ ноября 2010 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Солёные озёра являются уникальными природными экосистемами, характеризующимися высоким содержанием минеральных солей. Специфическим типом солёных водоёмов являются содовые озёра. Для них характерно наличие фракции щелочных карбонатов Na и K, которые и обуславливают стабильно высокий уровень pH в данных водоёмах. Несмотря на определённое сходство по своим физико-химическим условиям с морскими экосистемами, солёные озёра значительно менее исследованы. Изучение содовых озёр на территории России впервые было проведено группой под руководством Б.Л. Исаченко в 1930 году (Исаченко, 1951). Интерес к изучению галоалкалофильных микробных сообществ снова возник лишь спустя несколько десятилетий, и был обусловлен прикладными задачами поиска щелочеустойчивых экзогидролаз, используемых в качестве добавок к моющим средствам.

Высокая концентрация солей в рассолах создаёт неблагоприятные условия для развития в них эукариотного сообщества и, тем самым, способствует сохранению в них реликтового микробного сообщества (Заварзин, 1993).

Благодаря активным исследованиям последних лет было показано, что в гиперсолёных содовых озёрах присутствуют все основные группы представителей фото- и хемолитотрофов, обеспечивающих полный цикл превращения вещества в системе.

Одним из наиболее значимых биогенных элементов, определяющих возможность существования и развития биосферы, является углерод. Важнейшей стадией в цикле углерода является процесс ассимиляции CO₂ автотрофными организмами, в состав которых в содовых озёрах входят как алкалофильные фототрофные (кислородные и анаэробные) бактерии, так и хемотротрофные бактерии, среди которых значительная роль принадлежит сероокисляющим (СОБ). Среди идентифицированных традиционными микробиологическими методами видов имеются представители алкалофильных фотоавтотрофов *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*, *Ectothiorhadosinus*, а также представители галоалкалофильных сероокисляющих бактерий *Thioalkalivibrio*, *Halothiobacillus*, *Thiohalospira*, *Thiohalorhabdus* и др.

В экстремальных условиях нередко обнаруживаются уникальные автохтонные микроорганизмы, не встречающиеся в других экосистемах, что свидетельствует об актуальности изучения биоразнообразия гиперсолёных мест обитания. Одним из перспективных направлений в изучении биоразнообразия гиперсолёных озёр является исследование состава микробной популяции с помощью методов молекулярной биологии. Чаще всего для этих целей

используется анализ генов 16S рРНК, однако в последнее время новым подходом становится анализ генов, кодирующих определённую функцию. Примерами таких генов-маркёров могут быть *cbbL/M* и *acI/B* гены, кодирующие ключевые ферменты наиболее распространённых циклов ассимиляции CO₂ – цикла Кальвина и восстановительного цикла трикарбоновых кислот (вЦТК), соответственно. Первичная структура этих ферментов достаточно консервативна и может быть использована в филогенетике.

Ключевым ферментом цикла Кальвина является рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РуБисКО). По структурным и функциональным особенностям у бактерий в настоящее время выделяют 2 формы фермента. Наиболее распространённой является форма I, большая субъединица которой кодируется *cbbL* генами. Внутри формы I существует разделение на 2 варианта: «зелёный», обнаруживаемый у протеобактерий, зелёных растений и водорослей, и «красный», преимущественно обнаруживаемый у α -, β -протеобактерий, а также красных водорослей. Форма II фермента, кодируется *cbbM* генами, встречается значительно реже.

Гены, кодирующие β -субъединицу АТФ-зависимой цитратлиазы (*acI/B*), имеют две структурные формы, присущие соответственно хемоавтотрофным представителям ϵ -протеобактерий и филы Aquificae и фотоавтотрофам филы Chlorobi.

Анализ *cbbL/M* и *acI/B* генов в природных образцах позволяет получить достоверную информацию о составе CO₂-ассимилирующей части микробной популяции, не прибегая к традиционным методам выделения микроорганизмов в чистую культуру. Это особенно актуально в случае исследования гиперсолёных озёр, так как культивирование некоторых групп экстремально галоалкалофильных автотрофных микроорганизмов часто затруднительно в связи с особенностями метаболизма последних.

Для реализации данного подхода с успехом применяются методы ПЦР и клонирования, с последующим созданием клоновых библиотек. Дальнейший анализ библиотек клонов в дополнение к классическим методам микробиологии даёт возможность получить более полную информацию о составе автотрофной части микробной популяции солёных и содовых водоёмов, и позволяет выявить представителей пока ещё некультивируемых групп автотрофов.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось проведение сравнительного анализа генов ключевых ферментов фиксации CO₂ у фото- и хемоавтотрофных бактерий и использование этих генов в качестве молекулярных маркёров для оценки разнообразия автотрофных бактерий в осадках содовых озёр и гиперсолёных озёр с нейтральным pH.

Для выполнения цели были поставлены следующие задачи:

- провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей больших субъединиц генов РуБисКО, доступных в международной базе данных GenBank, для выявления участков со степенью консервативности 60% и более;
- на основании проведённого анализа усовершенствовать известные праймерные системы, а также сконструировать новые праймеры, пригодные для амплификации генов РуБисКО у бактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам;
- провести тестирование разработанных праймеров и оптимизировать условия ПЦР с использованием препаратов ДНК чистых культур фото- и хемоавтотрофных микроорганизмов, а также подобрать наиболее эффективные праймерные системы для амплификации этих генов в природных образцах;
- определить первичную структуру генов РуБисКО в геномах представителей различных таксономических групп фото- и хемоавтотрофных микроорганизмов (в том числе, выделенных из солёных озёр) и провести филогенетический анализ полученных *de novo* последовательностей;
- исследовать разнообразие генов РуБисКО и АТФ-зависимой цитратлиазы в осадках солёных и содовых озёр с использованием наиболее универсальных праймерных систем.

Научная новизна и практическая значимость работы. Разработаны новые праймерные системы, позволяющие эффективно амплифицировать гены РуБисКО формы I и формы II, пригодные для использования в экспериментальных филогенетических исследованиях;

Определена последовательность 101 фрагмента генов РуБисКО, принадлежащих представителям 9 родов галоалкалофильных хемоавтотрофных бактерий и 12 родов фотоавтотрофов, а также 4 последовательности *acI*B фотоавтотрофных бактерий рода *Chlorobaculum*. При этом впервые было проведено исследование генов РуБисКО для нескольких штаммов, принадлежащих к одному виду, и выявлены различия в наборе *cbb* генов на внутривидовом уровне. Кроме того, полученные данные были использованы для описания двух новых видов фототрофных бактерий родов *Ectothiorhodospira* и *Thiocapsa*. Все полученные последовательности депонированы в базу данных GenBank.

С помощью анализа *cbb* и *acI*B генов впервые проведено исследование состава автотрофной части микробной популяции на поверхности и в толще осадков гиперсолёных озёр с нейтральным значением pH и гиперсолёных содовых

озёр Кулундинской степи (Алтайский край, Россия) и озёрной системы Вади Натрун (Египет).

Полученные в этой работе данные существенно расширяют наши знания о составе микробной популяции содовых озёр, что позволяет лучше понять структурные и функциональные взаимоотношения внутри микробного сообщества и оценить потенциал содовых озёр как уникальных с точки зрения экологии природных объектов.

Публикации и апробация работы. По результатам работы опубликовано 4 статьи, 2 статьи приняты в печать. Основные положения и результаты работы были представлены на следующих конференциях: 1) 3rd Congress of European Microbiologists: «Microbes and Man – interdependence and future challenges», June 28 - July 2, 2009, Gothenburg, Sweden; 2) Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов», 24 -27 декабря 2009, Москва, Россия; 3) 9th International conference on halophilic microorganisms “Halophiles 2010”, June 29 – July 3, 2010, Beijing, China.

Структура и объём работы: Материалы диссертации изложены на 146 страницах машинописного текста и включают 29 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы», который содержит 30 отечественных и 132 иностранных наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе были исследованы чистые культуры фотоавтотрофных бактерий из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ (9 штаммов), а также коллекция штаммов фото- и хемоавтотрофных бактерий (43 штамма), предоставленная лабораторией экологии и геохимической деятельности микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н.Виноградского РАН (ИНМИ).

В работе также были исследованы образцы осадков различных солёных/содовых озёр (табл. 1), основная часть которых расположена на территории Кулундинской степи, что находится на юге Алтайского края, вдоль границы с Казахстаном. Образцы осадков 6 солёных/содовых озёр Кулундинской степи и 1 образец из оз. Вади Натрун предоставлены д.б.н. Сорокиным Д.Ю. (лаб. экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, ИНМИ). Образцы осадков из 4 солёных/содовых озёр Кулундинской степи были собраны во время экспедиции в Алтайский край в 2009 году. Некоторые физико-химические

характеристики исследованных озёр приведены в таблице 1. Они могут значительно отличаться в зависимости от локальных климатических условий, и также в зависимости от сезона, когда были отобраны пробы. Образцы осадков были отобраны в разные годы в летний период. Глубина озёр в этот период была небольшой и составляла в среднем 10-50 см. Некоторые озёра оказались почти высохшими. До проведения исследования образцы осадков хранили при 4°C.

Таблица 1. Физико-химические характеристики исследованных озёр.

№ образца	Название озера и время сбора материала	pH	Солёность, г/л	Способ отбора проб
Гиперсолёные озёра с высоким значением pH				
05-2	Смесь осадков из 5 озёр (2005 год)	9.5 – 9.95	110 – 400	Интегральные пробы (смесь осадков 0–10 см)
05-3	Смесь осадков из 4 небольших озёр (2005 год)	10.0 – 10.4	50 – 130	
T5-07	Танатар-5 (2007 год)	10.35	70	
S-06	Смесь осадков из 15 небольших озёр (2006 год)	9.45 – 10.6	30 – 206	
05-1	Танатар-1 (2005 год)	9.79 – 11.05	320 – 520	
WN-Σ	Вади Натрун (Египет) (2001 год)	9.75 – 10.3	200 - 360	
4KL	Горчина-1 (2009 год)	10.16	300	Поверхностный слой осадков (0-1 см)
6KL	Танатар-5 (2009 год)	10.1	180	
Гиперсолёные озёра с нейтральным значением pH				
14KL	Бурлинское (2002 год)	7.45	360	Интегральная проба (0–10 см)
2KL	Петухово (солёное) (2009 год)	7.45	300	Поверхностный слой осадков (0-1 см)
8KL	Ломовое (2009 год)	7.8	325	

Выделение ДНК. ДНК из чистых культур выделяли методом Бирнбойма-Доли (Birnboim and Doly, 1979) с использованием набора для Wizard-технологии «Promega» (США). ДНК из осадков содовых озёр получали с помощью набора для выделения тотальной ДНК из почв MoBio (MoBio Power Soil DNA Isolation kit; MoBio Laboratories). Для осаждения песка и крупных иловых частиц 10г осадка отмывали в 1М NaCl и затем трёхкратно центрифугировали, перенося каждый раз надосадочный слой в новую пробирку. Полученную таким образом коллоидную фракцию использовали затем для выделения ДНК.

Выбор праймеров для амплификации генов РубисКО форм I и II. Для выявления консервативных участков в гене, кодирующем большую субъединицу РубисКО, был проведён сравнительный анализ более чем 100 нуклеотидных последовательностей по каждой форме РубисКО, доступных в базе GenBank. В

результате проведённого анализа в последовательности гена были выявлены участки со степенью консервативности более 60%, для которых были сконструированы праймеры длиной 20-25 нуклеотидов.

ПЦР и клонирование. Амплификацию генов 16S рРНК проводили с универсальными праймерами 11F, 519R, 1492R согласно протоколу Lane (1991). Для амплификации генов РуБисКО использовали как разработанные нами праймерные системы, так и праймеры, опубликованные в литературе ранее, но модифицированные нами с учётом появившихся в последнее время в базе данных последовательностей РуБисКО (табл. 2).

Таблица 2. Праймерные системы для амплификации генов РуБисКО, использованные в работе.

Праймер	Форма РуБисКО	Последовательность праймера 5'-3'	Ссылка
cbbLG1f	Форма I «зелёный» вариант	GGCAACGTGTTCCGGSTTCAA	Selesi et al., 2005
cbbL1106R		CRTGRATVCCRCCIGAIGCIACVG	Разработан в данной работе
RubIgF		GAYTTCACCAARGAYGAYGA	Спиридонова и др., 2004
RubIgR		TCRAACTTGATYTCYTCCA	Спиридонова и др., 2004
gr184f		GGNACNTGGACCACNGTNTGGAC	Alfreider et al., 2003
gr781r		GTARTCGWGCATGAYGATSGG	Alfreider et al., 2003 (с изменениями)
RubIrF	Форма I «красный» вариант	GCVACCTGGACSGTSGTVTGG	Спиридонова и др., 2004
RubIrR		TCGCCYTCSAGCTTGCCSAC	
RubII331f	Форма II	AACAACCARGGYATGGGYGA	Разработан в данной работе
RuIIR2		TGRCCIGCICGRTGRTARTGCA	Спиридонова и др., 2004
RubII1113r		SGCGTTCATGCCSSAGATGATCGGSGT	Elsaid et al., 2007 (с изменениями)

При обозначении вырожденных позиций для всех используемых праймеров приняты следующие сокращения: Y=T,C; R=A,G; M=A,C; K=T,G; W=A,T; S=G,C; B=T,G,C; V=A,G,C; D=A,T,G; H=A,T,C; N=G,A,T,C

Фрагменты *acI*/В генов амплифицировали с использованием праймеров 892F – 1204R для хемоавтотрофных бактерий (Campbell et al., 2003) и 48F-1063R для фототрофных зелёных серных бактерий (Ивановский Р.Н., неопубликованные данные). Очистку ПЦР-продуктов выполняли с помощью набора QIAquick gel extraction kit (Qiagen) согласно рекомендациям производителя. Очищенные ПЦР-фрагменты секвенировали или клонировали с использованием компетентных клеток *Escherichia coli* TOP10 и набора реактивов CloneJet PCR Cloning kit (Fermentas) с плазмидой pJET1.2 / blunt согласно рекомендациям производителя.

Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с помощью набора “Wizard MiniPrep” (Promega, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей. Сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программы NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Проверку и редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Выбранные последовательности выравнивали между собой с помощью программы CLUSTAL W v 1.75 (Thompson et al., 1994). Построение филогенетических деревьев проводили с использованием алгоритмов: neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987), реализованного в пакете программ TREECON W (Van de Peer and De Wachter, 1994), и алгоритма maximum-likelihood в пакете программ PhyML (Guindon & Gascuel, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка праймерных систем для амплификации генов РуБисКО формы I и формы II. К моменту выполнения данной работы в литературе были описаны несколько праймерных систем для амплификации этих генов (Elsaied et al., 2001; Alfreider et al., 2003; Спиридонова и соавт., 2004; Selesi et al., 2005). Однако в большинстве случаев они были сконструированы на основании сравнения нуклеотидных последовательностей *cbb* генов ограниченного числа видов микроорганизмов и были пригодны для амплификации искомым генов у бактерий, относящихся к определённым таксономическим группам. Значительное расширение базы данных нуклеотидных последовательностей различных генов, в том числе генов РуБисКО, позволило провести анализ распределения консервативных участков в последовательности генов РуБисКО и разработать новые праймерные системы для их амплификации.

Для определения положения консервативных участков в гене, кодирующем форму I РуБисКО, были проанализированы более 150 нуклеотидных последовательностей, принадлежащих различным группам бактерий. Для конструирования праймеров формы II РуБисКО было проанализировано около 100 последовательностей. Для каждой формы РуБисКО была построена консенсусная последовательность, в которой с помощью специально разработанной программы (Марусина А.И., неопубликованные данные) были определены консервативные участки. Для подбора праймеров были выбраны участки со степенью консервативности 60% и более.

По результатам анализа были выбраны следующие системы праймеров: для амплификации РуБисКО формы I «зелёного» варианта – система cbbLG1F /cbbLr,

ограничивающая участок *cbbL* гена длиной около 850 пар нуклеотидов; для амплификации гена формы II – система RuII331F /RuII1113R, ограничивающая участок *cbbM* гена длиной около 800 нуклеотидов. Последовательности разработанных праймеров указаны в табл. 2 разделе «Объекты и методы исследования».

2. Тестирование разработанных праймеров. Проверка эффективности работы разработанных праймеров проводилась на культурах автотрофов с известной нуклеотидной последовательностью генов РуБисКО. Среди них *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFY (гены *cbbL* и *cbbM*), *Thioalkalimicrobium sibiricum* AL7 (ген *cbbL*) и *Rhodospirillum rubrum*. 1R (ген *cbbM*). Условия ПЦР были оптимизированы посредством проведения ПЦР с градиентом температуры отжига праймеров в диапазоне от 56 до 66°C. Оптимальная температура отжига для пары *cbbLG1F* – *cbbLr* составила 60°C, для пары RuII331F – II1113R - 62°C. Условия и протоколы ПЦР приведены в главе диссертации «Материалы и методы».

В результате ПЦР у всех контрольных штаммов были получены амплификаты соответствующей длины. Все фрагменты были секвенированы с использованием специфических прямого и обратного праймеров. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал высокую степень гомологии с депонированными в GenBank последовательностями данных генов.

Это позволяет использовать данные системы праймеров для детекции *cbbL* и *cbbM* генов как у фото-, так и у хемоавтотрофных бактерий.

3. Детекция генов РуБисКО формы I и формы II у фото- и хемоавтотрофных бактерий. Разработанные системы праймеров были использованы для выявления *cbbL/M* генов в геномах фото- и хемоавтотрофных бактерий, большинство из которых были выделены из различных солёных и содовых озёр. Всего в работе было проанализировано 18 штаммов фотоавтотрофов и 32 штамма хемоавтотрофов. Список исследованных культур приведён в разделе диссертации «Материалы и методы».

3.1 Выявление и филогенетический анализ *cbbL/M* генов у различных фотоавтотрофных бактерий. Первичная последовательность генов РуБисКО была определена у представителей 14 родов фотоавтотрофных бактерий, многие из них были выделены из солёных и содовых озёр. Все исследованные культуры фиксируют CO₂ в цикле Кальвина.

Для проведения исследования использовалась система специфических олигонуклеотидных праймеров, включающая праймеры амплификации генов «зелёного» и «красного» вариантов формы I, а также генов формы II РуБисКО. Фрагменты генов РуБисКО разных форм были выявлены у всех исследуемых

культур. Все полученные *de novo* последовательности выявили высокую степень гомологии (более 80%) с последовательностями РубисКО других фотоавтотрофов, доступными в электронной базе GenBank.

Большинство из исследованных нами фототрофных бактерий относились к подразделению γ -протеобактерий, внутри которого входили в состав семейств *Ectothiorhodospiraceae* и *Chromatiaceae*. Наборы и структура генов РубисКО у представителей этих семейств значительно отличаются. Филогения РубисКО у представителей *Ectothiorhodospiraceae* была исследована ранее (Tourova et al., 2007). Все они содержали в геноме по одному гену «зелёного» варианта формы I РубисКО и образовывали на *cbbL*-дереве единый монофилетический кластер. В геноме исследованного в данной работе нового штамма Mg3, идентифицированного как представитель вида *Halorhodospira halophila*, также был обнаружен единственный ген «зелёного» типа формы I, последовательность которого была идентична таковой типового штамма этого вида (100% для нуклеотидов и аминокислот).

Однако, исследованные нами два штамма В7-7 и М-10, описанные как новый вид *Ect. magna*, образовывали на *CbbL*-дереве ветвь в кластере с членами семейства *Chromatiaceae*, а не с другими членами рода *Ectothiorhodospira*.

Было также подтверждено необычное положение на дереве бактерий рода *Thiorhodospira*: новый штамм *Ts. sibirica* В8-1 вместе с типовым штаммом этого вида на дереве РубисКО группировался не с γ -протеобактериями, а с α -протеобактериями. Поскольку, нуклеотидный состав и частота использования кодонов у типового штамма оказались одинаковыми для гена РубисКО и для тотального генома в целом, но при этом заметно отличались от таковых у α -протеобактерий, то этот феномен был, предположительно, объяснён увеличением скорости несинонимичных замен, а не горизонтальным переносом генов (Tourova et al., 2007).

Сведений о структуре РубисКО у представителей семейства *Chromatiaceae* относительно немного. До нашего исследования единственным изученным в этом отношении организмом был типовой штамм вида *Allochrodatum vinosum*, в геноме которого были обнаружены 2 различных *cbbL*-гена «зелёного» типа формы I. Полученные в нашей работе данные позволили существенно расширить круг представителей *Chromatiaceae* с известной структурой генов, кодирующих РубисКО. Нами были исследованы 10 представителей данного семейства. У некоторых штаммов были обнаружены два гена, кодирующих форму I РубисКО. Среди них типовой штамм вида *A. minutissimum* (Турова и соавт., 2009) и три штамма *Thioalkalicoccus limnaeus*. Каждый из *cbbL* генов *A. minutissimum* и

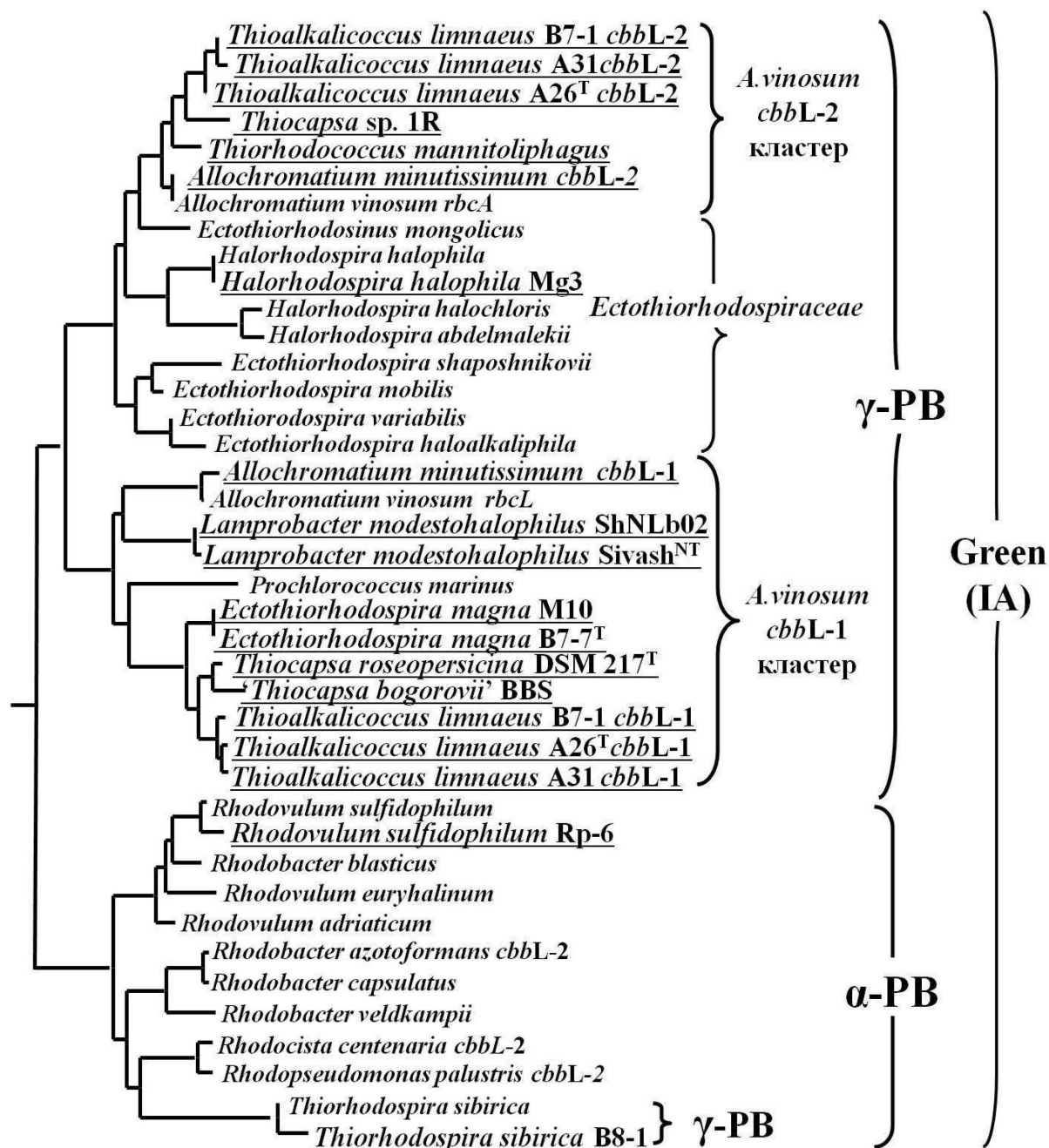


Рис. 1. Филогенетическое дерево фотоавтотрофных бактерий, построенное на основании сравнительного анализа генов РуБисКО формы I с использованием алгоритма neighbor-joining. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью бутстреп-анализа (bootstrap). Последовательности, определённые в данном исследовании выделены жирным шрифтом и подчёркнуты.

Thc. limnaeus группировался вокруг соответствующего гена *A. vinosum*, расширяя тем самым кластеры «*A. vinosum* cbbL-1» и «*A. vinosum* cbbL-2». Другие изученные нами представители семейства, среди которых 3 представителя рода *Thiocapsa* (типовые штаммы *Tc. roseopersicina*, *Th. bogorovii* и штамм *Thiocapsa* sp.1R), 2 представителя рода *Lamprobacter*, и типовой штамм вида

Thiorhodococcus mannitolifagus WS^T, имели по одному *cbbL*-гену. При этом последовательности этих генов имели высокую степень гомологии с известными для каждого рода *cbbL*-последовательностями, и на общем древе формы I группировались вокруг *cbbL*-1 или *cbbL*-2 генов *A. vinosum*.

В данной работе впервые было показано наличие у *Chromatiaceae* одновременно генов, кодирующих форму I и форму II РуБисКО. Такими примерами стали 3 штамма алкалофильного *Tha. limnaeus* и штамм галофильного *Lamprobacter modestohalophilus* Sivash^{NT}. Интересен тот факт, что у другого штамма *L. modestohalophilus* ShNLb02 генов формы II РуБисКО не обнаружено, что является примером отличий в наборе генов РуБисКО на внутривидовом уровне.

На основании полученных данных можно предложить гипотетическую схему эволюции генов РуБисКО у фотоавтотрофных представителей порядка Chromatiales (рис. 2).

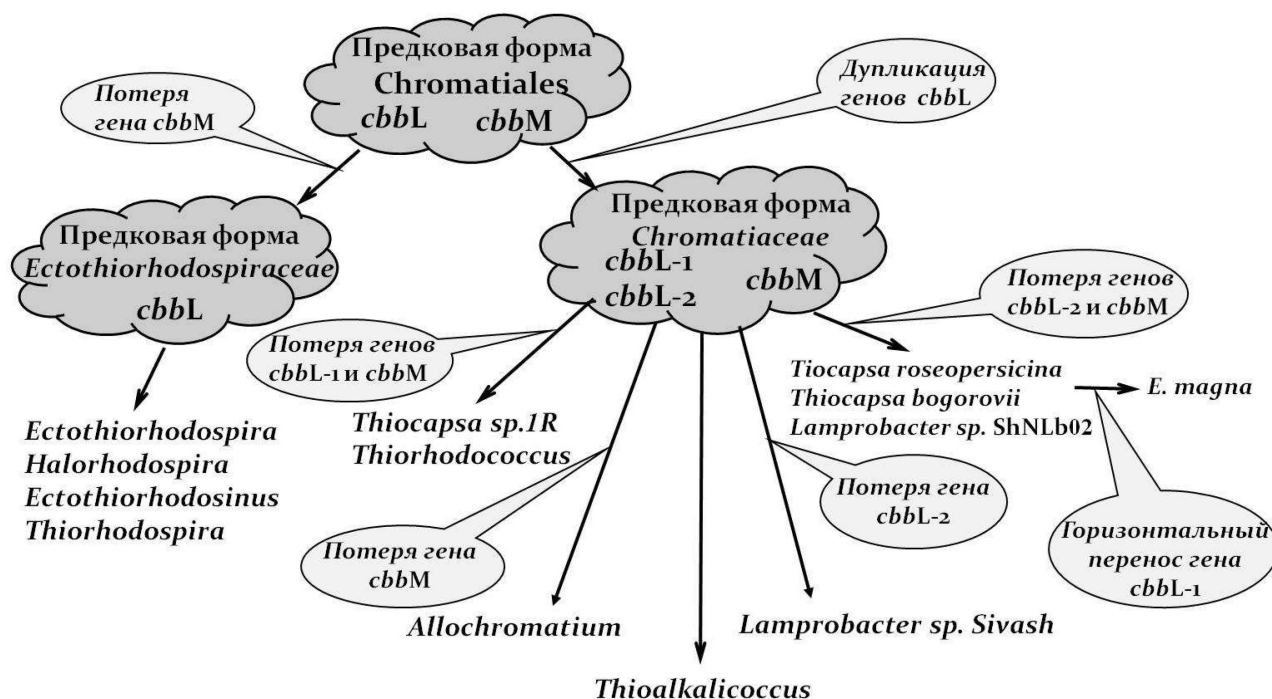


Рис. 2. Гипотетическая схема эволюции генов РуБисКО у фотоавтотрофных представителей порядка Chromateales.

Вероятно, общий предок Chromatiales имел в геноме единственную копию гена, кодирующего фермент формы I и ген формы II. Представители *Ectothiorhodospiraceae* унаследовали предковую форму гена *cbbL*, потеряв при этом ген *cbbM*. В процессе эволюции другой ветви – семейства *Chromatiaceae* – произошла дупликация гена *cbbL*, результатом которой мог стать тройной набор генов РуБисКО (*cbbL*-1, *cbbL*-2 и *cbbM*), обнаруженный нами у представителей

Thioalkalicoccus. Далее в процессе эволюции других видов *Chromatiaceae* происходили потери как генов *cbbM*, так и избирательно одного из двух *cbbL* генов предковой формы. Кроме того, представитель вида *E. magna*, по-видимому, приобрел ген *cbbL-1* в результате горизонтального переноса генов.

В отличие от большинства пурпурных серных γ -протеобактериями, пурпурные несерные α -протеобактерии оказались более разнообразными по составу генов РубисКО. Штаммы *Rhodoblastus acidophilus* 5-6 и *Rhodomicrobium vannielii* К-1, принадлежащие к порядку Rhizobiales, содержали в геноме «красный» вариант формы I, также как и единственный исследованный в данной работе представитель подразделения β -протеобактерий *Rubrivivax gelatinosus*. При этом штаммы *Rbl. acidophilus* 5-6 и *Rv. gelatinosus* образовывали новые ветви внутри кластера «красного» типа РубисКО, а *Rhm. vannillei* К-1 был близок к типовому штамму этого вида (97.3% сходства аминокислот). Ещё два представителя α -протеобактерий: коллекционный штамм Rp-6 вида *Rhodovulum sulfidophilum*, как и типовой штамм этого вида содержал в геноме двойной набор генов РубисКО: «зелёного» типа формы I и формы II; и штамм 5К вида *Phaeospirillum fulvum* – единственный ген формы II (см. рис. 1).

В целом, анализ генов РубисКО у фотоавтотрофных бактерий показал, что, несмотря на общие несоответствия филогений РубисКО и 16S рРНК, корреляция данных на уровне вида остаётся довольно чёткой. Уровень видового сходства *cbbL/M* последовательностей составляет не менее 87.7% для нуклеотидов и не менее 97.0% для аминокислот. Таким образом, *cbb*-гены можно использовать в качестве молекулярного маркера в таксономических и экологических исследованиях в дополнение к традиционному методу анализа генов 16S рРНК.

3.3 Выявление и филогенетический анализ *cbbL/M* генов в группе хемоавтотрофных галофильных СОБ. В работе были исследованы несколько групп умеренно и экстремально галофильных облигатно хемолитоавтотрофных СОБ, выделенных из различных гиперсолёных водоёмов. Большинство штаммов принадлежали к новым таксонам родового ранга в подразделении γ -протеобактерий (Sorokin et al., 2006; 2007a, b; 2008b). Для оценки уровня внутривидовой варибельности генов РубисКО нами было проведено исследование нескольких штаммов одного вида.

Фрагменты генов «зелёного» типа формы I РубисКО были выявлены у всех штаммов, тогда как амплификация с использованием специфичных праймеров «красного» типа не дала положительных результатов ни для одной из исследуемых культур галофилов.

Топологии 16S рРНК и *cbbL* деревьев для исследуемых микроорганизмов в некоторой степени совпадали: каждая группа штаммов образовывала отдельные

Рис. 3. Положение галоалкалофильных СОБ на дереве транслированных аминокислотных последовательностей *cbbL* генов в сравнении с 16S рПНК-деревом. Дендрограммы построены с использованием алгоритма neighbor-joining. Совпадающие позиции выделены серым. Масштаб указывает на количество замен на каждые 100 нуклеотидов. Точки ветвления с уровнем бутстреп ниже 70% коллапсированы на общую ось ветвления. Исследованные в данной работе штаммы подчеркнуты. Серым цветом выделены кластеры, положение которых совпадает на обоих типах деревьев.

глубокие ветви как на «рибосомном» дереве, так и на дереве генов формы I РуБисКО. Уровень внутривидового сходства последовательностей РуБисКО был достаточно высок, составляя в среднем 97.5 – 100%. Однако взаимное расположение некоторых кластеров относительно других γ -протеобактерий на *cbbL*-дереве отличалось от такового на «рибосомном» дереве (рис. 3). Основные несоответствия касались группы штаммов *Thiohalospira halophila*. Большинство штаммов этого вида на дереве *cbbL* генов группировались в единый кластер, однако, два штамма *Th. halophila* (HL4 и HL21) и *Th. alkaliphila* образовывали ветви в кластере фото- и хемотрофных γ -протеобактерий, сформированном вокруг одного из *cbbL* генов *Allochromatium vinosum* («*A. vinosum-cbbL-1*» кластер).

Другим примером различий в топологиях деревьев является положение факультативно галоалкалофильного вида *Thioalkalibacter halophilus* ALCO1, который, согласно анализу генов 16S рПНК был наиболее близок к *Halothiobacillus*. Обнаруженный у него ген формы I РуБисКО оказался близким по структуре к одному из *cbbL* генов галофильной СОБ *Thiomicrospira halophila*, выделенной из гиперсолёных озёр ранее. Вместе оба штамма группировались вокруг *rbcL* гена *A. vinosum*, расширяя тем самым «*A. vinosum-cbbL-1*» кластер.

Праймерная система RubII331f/RubII113r, специфичная для амплификации формы II РуБисКО позволила получить фрагменты соответствующих генов у всех штаммов рода *Thiohalomonas*, большинства штаммов *Thiohalorhabdus*, и лишь у отдельных штаммов *Halothiobacillus* и *Thiohalospira*. Противоречия в топологиях 16S рПНК и *CbbM*-деревьев наблюдались в положении групп штаммов *Thiohalospira* и *Halothiobacillus* (рис. 4). На *cbbM*-дереве кластер штаммов HL1, HL2 и HL27 не связан с единственным видом *Halothiobacillus neapolitanus*, и образует отдельную ветвь в кластере автотрофных СОБ *Acidithiobacillus*, *Thiobacillus* и *Thiomonas*. Однако наиболее заметным несоответствием филогений стало близкое сходство последовательностей *cbbM* генов между представителями *Thiohalospira* и *Thiohalorhabdus*, которые оказались достаточно удалены друг от друга согласно данным анализа 16S рПНК и *cbbL* генов.

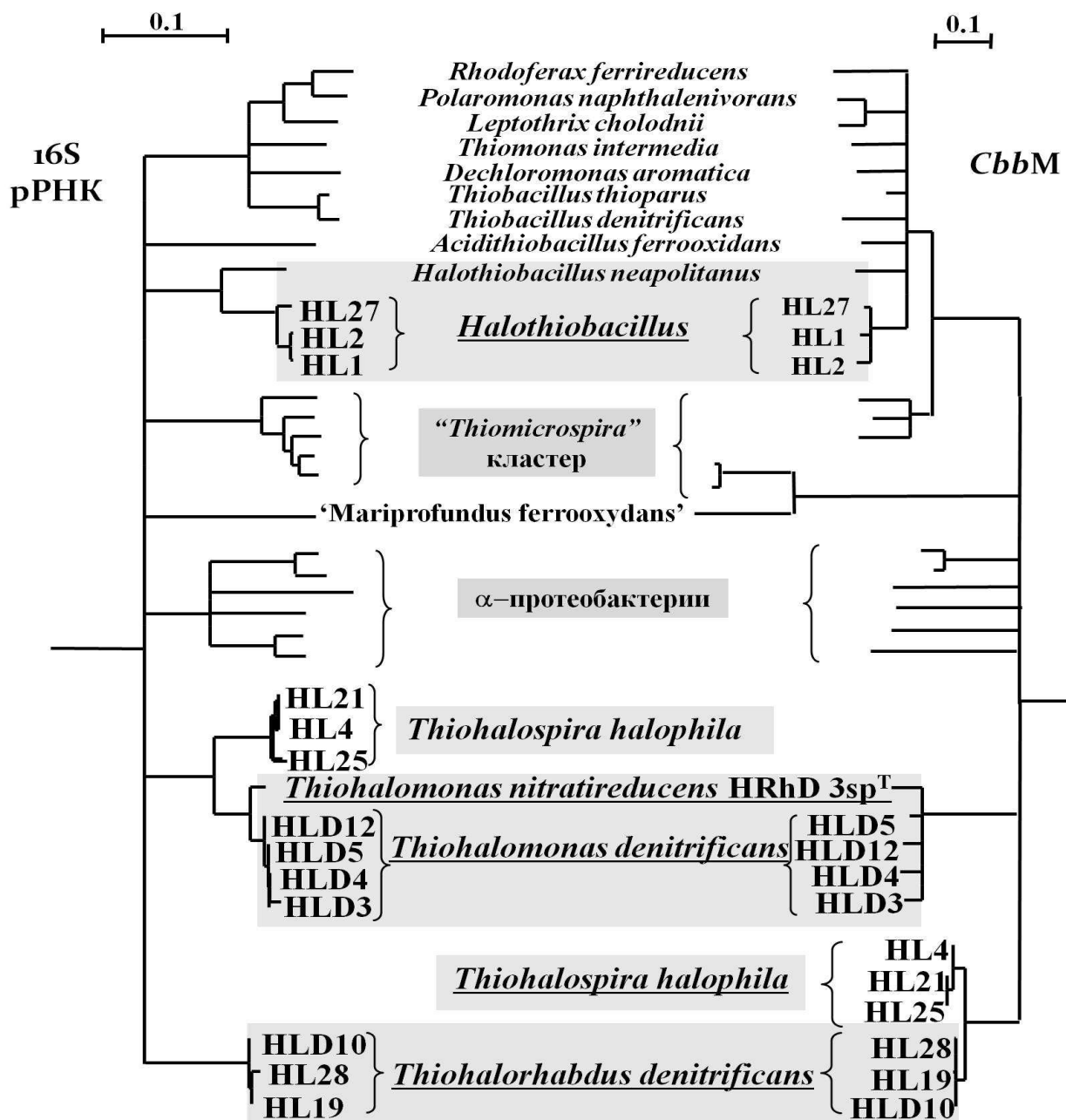


Рис. 4. Положение галоалкалофильных СОБ на дереве транслированных аминокислотных последовательностей *cbbM* генов в сравнении с 16S pPHK-деревом. Дендрограммы построены с использованием алгоритма neighbor-joining. Совпадающие позиции выделены серым. Масштаб указывает на количество замен на каждые 100 нуклеотидов. Точки ветвления с уровнем бутстреп ниже 70% коллапсированы на общую ось ветвления. Исследованные в данной работе штаммы подчёркнуты.

Подобные противоречия вероятнее всего объясняются процессами горизонтального переноса генов РуБисКО от одной группы бактерий к другой. С учётом того, что ферменты формы I и формы II имеют разные кинетические характеристики и отличаются по степени сродства к CO₂, процессы приобретения / потери генов разных форм РуБисКО могут быть обусловлены необходимостью наиболее полной адаптации к условиям занимаемой

экологической ниши. Горизонтальный перенос, вероятнее всего может являться причиной различий в наборе генов РуБисКО у штаммов, принадлежащих к одному виду. До настоящего времени в литературе не было данных о подобных внутривидовых различиях структуры генома. До сих пор можно было сравнить состав и структуру генов РуБисКО только для двух различных штаммов вида *Ac. ferrooxidans* (типового штамма ATCC 23270 и штамма ATCC 53993), у которых эти гены оказались идентичными по составу и близкими по структуре.

Разный состав генов РуБисКО внутри вида также был продемонстрирован в нашем исследовании фотоавтотрофных бактерий (см. раздел 3.1), что может говорить о необходимости выполнения в дальнейшем исследований нескольких штаммов одного вида для оценки вариабельности их геномов.

4. Детекция генов РуБисКО в образцах осадков солёных и содовых озёр.

Анализ генов, кодирующих большую субъединицу РуБисКО был использован для оценки разнообразия автотрофов, фиксирующих CO_2 в цикле Кальвина. Автотрофное звено в трофической структуре гало(алкало)фильного сообщества представлено окислительными и аноксигенными фотоавтотрофами, а также хемолитоавтотрофами, среди которых сероокисляющие бактерии (СОБ) имеют наиболее эффективный метаболизм в экстремальных условиях высокой солёности и pH.

К автотрофам относят также метаногенов и сульфатредукторов, однако они фиксируют CO_2 с использованием нециклических путей и не являются предметом данного исследования.

Главным образом, в работе были исследованы образцы осадков из различных озёр Кулундинской степи, отличающихся по уровню солёности и pH. Дополнительно была исследована смесь осадков из системы содовых озёр Вадии Натрун (Египет). Образцы условно были разделены на две группы: 1) образцы из умеренно-солёных и гиперсолёных содовых озёр; 2) образцы из гиперсолёных озёр с нейтральным pH. Также образцы отличались по способу отбора проб (интегральные пробы и поверхностный слой осадков). Список и основные характеристики озёр приведены в таблице 2 в разделе «Объекты и методы исследования».

4.1 Детекция генов, кодирующих форму I и форму II РуБисКО в умеренно-солёных и гиперсолёных содовых озёрах с высоким pH. Для выявления генов формы I РуБисКО первоначально применяли разработанные в данной работе праймеры. С их помощью были получены 4 библиотеки клонов для образцов смешанных осадков умеренно-солёных озёр 05-2, 05-3, S-06 и образца T5-07 из оз. Танатар-5. Каждая библиотека содержала в среднем по 50 клонов. По результатам сравнительного анализа клонов, нуклеотидные последовательности с

уровнем гомологии 99% и выше были объединены в один филотип (OTU – operational taxonomic unit), таким образом, в каждой библиотеке было выделено от 2 до 4 филотипов. Состав 4-х библиотек оказался схожим (рис. 5).

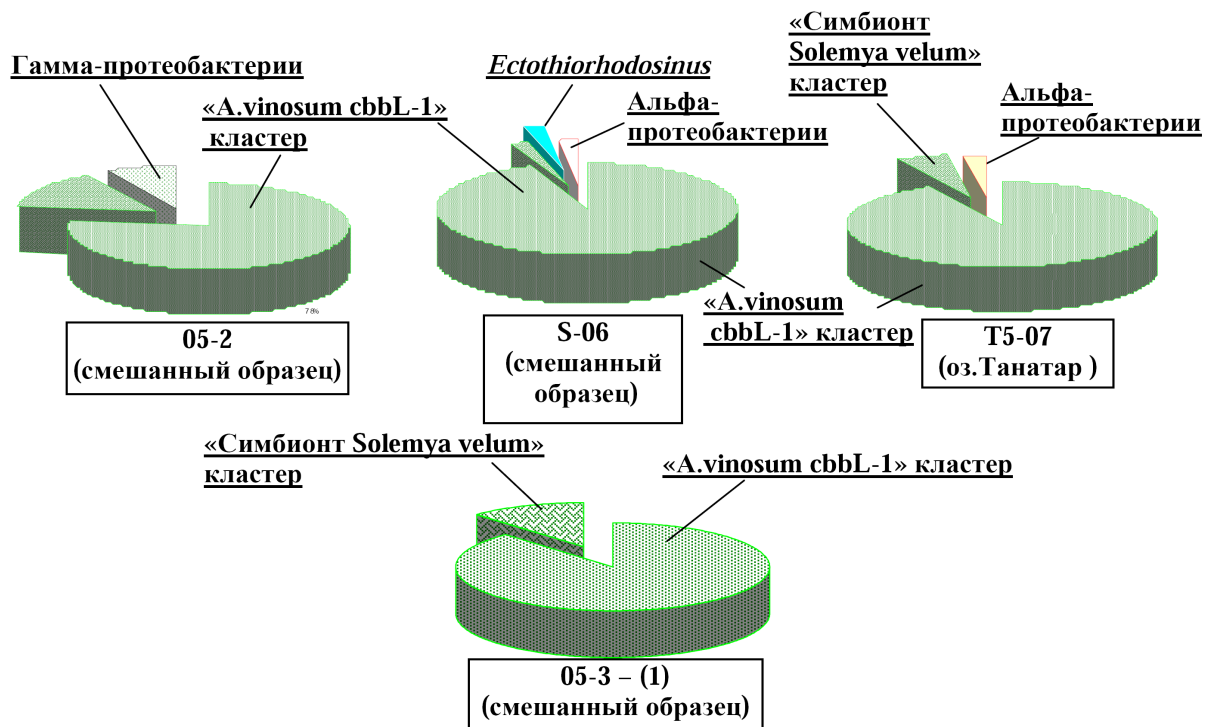


Рис. 5. Распределение *cbbL*-филотипов в библиотеках из умеренно-солёных содовых озёр.

Доминирующей в каждой библиотеке была группа неидентифицированных филотипов γ -протеобактерий. На CbbL-дереве они объединялись с «*A.vinosum cbbL-1*» кластером, который, как было показано ранее, включает как фото-, так и хемоавтотрофных бактерий. В качестве минорных были обнаружены также общий для всех библиотек филотип, родственный последовательности *cbbL* гена эндосимбионта глубоководного моллюска *Solemya velum* и филотип фототрофного *Ectothiorhodospinus*.

Кроме того, в образцах из умеренно-солёных озёр T5-07 (оз. Танатар-5) и смеси осадков S-06 присутствовали филотипы «красного» варианта формы I, принадлежащие неизвестным в настоящее время представителям α -протеобактерий.

Неожиданным стало отсутствие в исследованных библиотеках филотипа, филогенетически близкого бактериям рода *Thioalkalivibrio*, представители которого являются наиболее распространённой группой в содовых озёрах среди культивируемых сероокисляющих бактерий.

В связи с этим, для образца 05-3 была сконструирована дополнительная клоновая библиотека с использованием менее вырожденной пары праймеров

RubIgF/RubIgR, ранее показавшей свою эффективность для детекции генов «зелёного» варианта формы I РубисКО у представителей семейства *Ectothiorhodospiraceae*. В результате первичного сравнительного анализа в дополнительной библиотеке 05-3(2) было выделено 10 OTU (вместо 2 OTU в библиотеке 05-3(1)) (рис. 6).

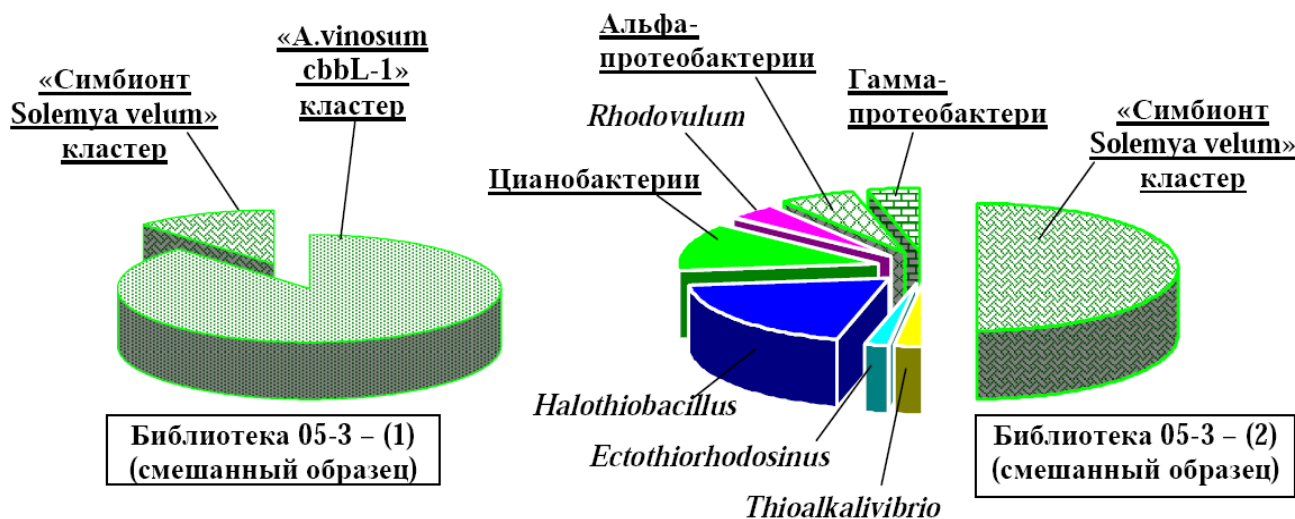


Рис. 6. Распределение *cbbL*-филотипов в библиотеке 05-3-(1) и в дополнительно сконструированной библиотеке 05-3-(2).

Общим для библиотек 05-3(1) и 05-3(2) оказался только один филотип, родственный *cbbL* гену бактерии-симбионта *Solemya velum*, который в библиотеке 05-3(2) оказался преобладающим. Кроме того, в библиотеке 05-3(2) были обнаружены филотипы хемоавтотрофных *Halothiobacillus* и *Thioalkalivibrio*, и фототрофных *Rhodovulum*, *Ectothiorhodosinus* и цианобактерий.

В дальнейших исследованиях для анализа интегральных проб 05-1 и WN-S, и поверхностных проб 4KL и 6KL использовали пару праймеров RubIgF/RubIgR.

Состав смешанных образцов 05-1 и WN-S из гиперсолёных содовых озёр Танатар-1 и Вадн Натрун, соответственно, оказался схожим и был представлен двумя компонентами: доминирующим *Thioalkalivibrio* и минорным *Halorhodospira*, и таким образом, заметно отличался от состава образцов из умеренно-солёных озёр.

Библиотеки поверхностных слоёв оказались практически монотиповыми. Основная часть клонов в библиотеке 4KL распределилась между 3 филотипами, группировавшимися на дереве с *cbbL*-последовательностями *Halorhodospira*. Минорные филотипы представлены хемоавтотрофными *Thioalkalivibrio* и фототрофными цианобактериями. В библиотеке 6KL (оз. Танатар-5) доминировали цианобактерии, составляя 87% от общего разнообразия. В качестве минорных членов сообщества были обнаружены фотоавтотрофные *Ectothiorhodosinus*, а также неизвестная группа α -протеобактерий, несущих в

геноме «красный» вариант формы I РубисКО, сходная с обнаруженными ранее в интегральных пробах.

Некоторые филоотипы фото- и хемоавтотрофных бактерий, присутствующие в Кулундинских озёрах, были ранее найдены в умеренно-солёном содовом озере Моно Лейк (Калифорния, США) (Giri et al., 2004). Среди них *cbbL*-филоотипы, относящиеся к *Thioalkalivibrio*, *Ectothiorhodospinus* и цианобактериям. Однако в Моно Лейк не были обнаружены филоотипы бактерий, содержащих в геноме форму II РубисКО, тогда как в нашем исследовании они присутствовали в большинстве интегральных проб осадков (умеренно-солёных содовых 05-3, T5-07, S-06 и гиперсолёного содового WN-S).

Генетическое разнообразие *cbbM*-библиотек оказалось значительно ниже в сравнении с библиотеками формы I РубисКО. Библиотеки клонов формы II РубисКО были сконструированы только для 4-х образцов интегральных проб осадков. В каждой библиотеке было выделено от 2 до 6 филоотипов, каждый из которых объединял последовательности со степенью гомологии более 99%.

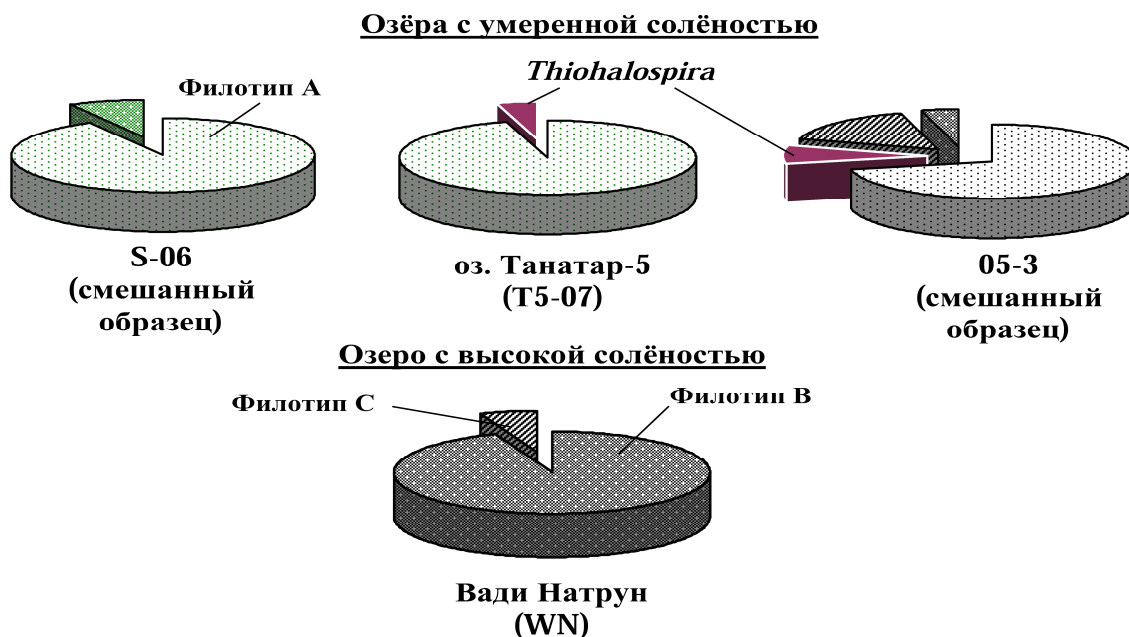


Рис. 7. *CbbM*-филоотипы, обнаруженные в интегральных пробах осадков умеренно-солёных и гиперсолёных содовых озёр.

Большинство филоотипов остались неидентифицированными, и образовывали на *CbbM*-дереве отдельные группы, не связанные близким родством с известными бактериями. В настоящее время оценить их филогенетический статус невозможно. Однако стоит отметить, что доминирующие филоотипы, обнаруженные в 3-х умеренно-солёных образцах оказались практически идентичными и не присутствовали в гиперсолёном озере Вади Натрун, где доминировали несколько близкородственных филоотипов неизвестных бактерий (рис. 7). При этом доминанты из Вади Натрун

присутствовали и в умеренно-солёных образцах, но только в качестве минорных членов сообщества. Некоторые минорные флотипы в умеренно-солёных образцах всё же удалось идентифицировать: в образце Т5-07 (оз. Танатар-5) и смешанном образце 05-3 присутствовали флотипы, родственные экстремально галофильной СОБ *Thiohalospira halophila* HL21, филогения генов РуБисКО которой была рассмотрена в разделе 3.3.

В поверхностных слоях осадков содовых озёр флотипов формы II РуБисКО не обнаружено.

4.2 Детекция генов, кодирующих большую субъединицу РуБисКО формы I и формы II, в осадках гиперсолёных озёр с нейтральным pH.

Для исследования были выбраны 3 наиболее типичные гиперсолёные озёра Кулундинской степи, с pH 7.45 – 7.8 и уровнем общей минерализации 300 – 360 г/л, в которых ранее культуральными методами были обнаружены основные группы галофильных СОБ, включающие *Halothiobacillus*, *Thiohalospira*, *Thiohalorhabdus*, *Thiohalomonas* и *Thiohaophilus*. Список озёр приведён с табл. 2 в разделе «Объекты и методы исследования».

Гены РуБисКО формы I и формы II были обнаружены во всех образцах.

Каждая из библиотек формы I содержала в среднем от 5 до 13 флотипов (рис 8).

Самой разнообразной оказалась библиотека из озера Ломовое (8KL). Примерно треть клонов от общего числа в библиотеке распределилась между 3 флотипами, принадлежащими цианобактериям. Следующими по числу клонов (около 25% от общего числа) оказались галофильные СОБ *Thioalkalivibrio*, *Halothiobacillus*, *Ectothiorhodospira*, *Thiohalophilus*, *Thiohalorhabdus*. Один из минорных флотипов отдалённо был связан с группой родов *Alkalispirillum*-*Alkalilimnicola*.

Заметно меньшее разнообразие *cbbL*-последовательностей было выявлено в поверхностных слоях осадков гиперсолёного озера Петухово (образец 2KL): по степени распределения *cbbL*-последовательностей между флотипами данная библиотека оказалась практически монотиповой. Большинство последовательностей имели уровень сходства более 97% и были объединены в один флотип, относящийся к роду *Halothiobacillus*. Минорные флотипы, представленные в среднем 1-3 последовательностями, оказались принадлежащими к *Thioalkalivibrio* и цианобактериям, наиболее близким к *Cyanothece* sp.

И, наконец, в гиперсолёном озере Бурлинское (14KL) присутствовали 7 *cbbL*-флотипов, большинство из которых были отдалённо связаны с

экстремально галофильной СОБ *Thiohalorhabdus denitrificans*, которая образует глубокую ветвь как на *cbbL* дереве, так и на дереве генов 16S рРНК.

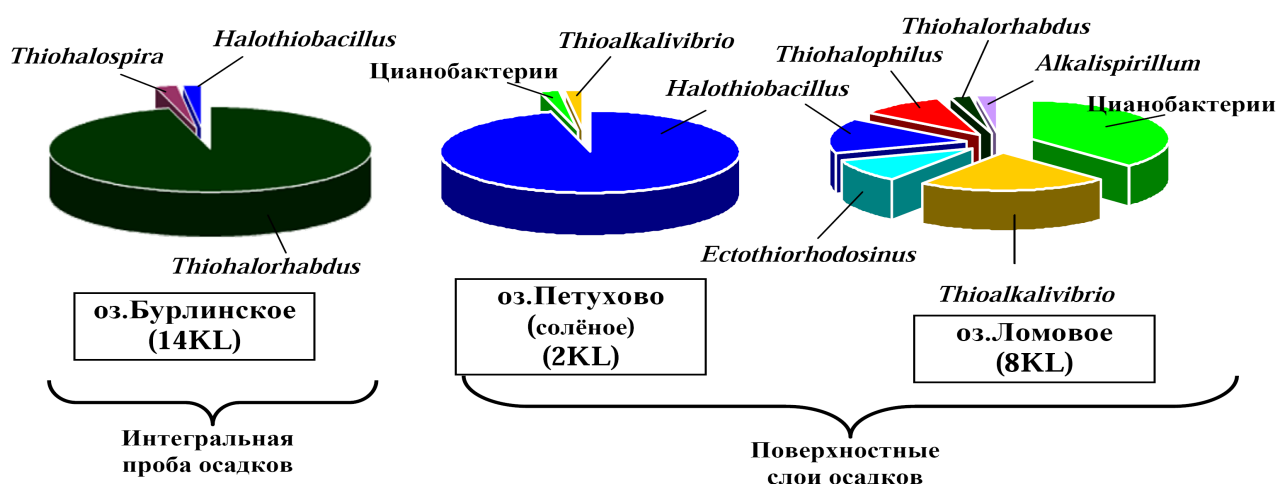


Рис. 8. Филотипы формы I РуБисКО, обнаруженные в интегральных пробах и поверхностных слоях осадков гиперсолёных нейтральных озёр.

Один из минорных филотипов оказался практически идентичным последовательности *cbbL* гена *Halothiobacillus halophilus*, тогда как другой был близок к двум штаммам *Thiohalospira halophila* HL4 и HL21, отличающихся необычным положением на дереве *cbbL* последовательностей (см. раздел 3.3).

В библиотеках формы II РуБисКО не было выявлено значительного разнообразия. В осадках оз. Ломовое (8KL) большая часть *cbbM*-филотипов осталась неидентифицированной. Лишь 25% от общего числа последовательностей удалось идентифицировать: они принадлежали умеренно-галофильному тиоденитрификатору *Thiohalomonas denitrificans*, несколько штаммов которого были выделены ранее, в том числе из кулундинских озёр.

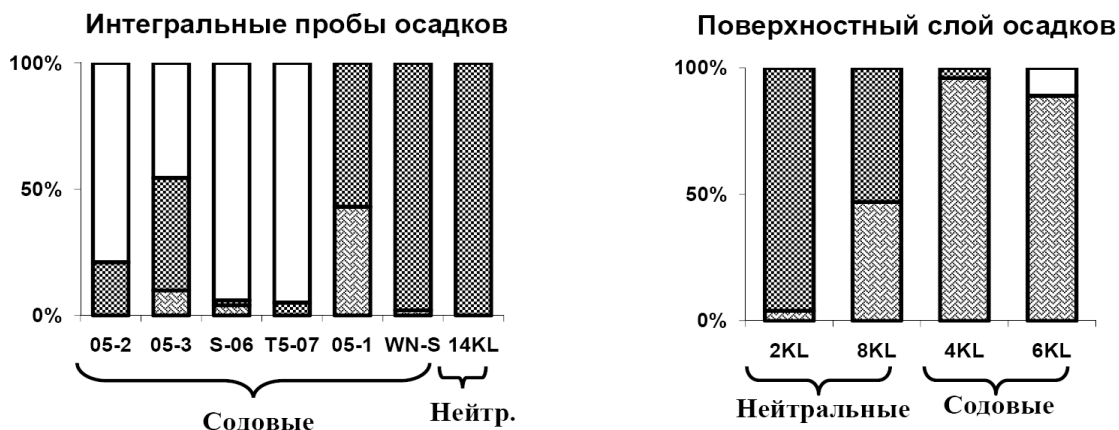
Доминирующие филотипы формы II в осадках оз. Бурлинское как и для формы I были родственны группе штаммов *Thiohalorhabdus denitrificans*, выделенных из гиперсолёных мест обитания ранее микробиологическими методами (Sorokin et al., 2008b). В качестве минорного компонента в сообществе присутствовали *cbbM*-филотипы, близкие *Halothiobacillus*.

Единственный *cbbM*-филотип, обнаруженный в поверхностном слое озера Петухово-солёное (2KL) идентифицировать не удалось.

В целом, результаты *cbb*-анализа не выявили значительного разнообразия автотрофов ни в содовых, ни в солёных озёрах. Многие филотипы остались неидентифицированными, что свидетельствует об уникальности микроорганизмов в гало(флкало)фильных сообществах.

Качественный состав сообществ автотрофов различался как в группе содовых озёр (умеренно-солёные и гиперсолёные), так и между гиперсолёными нейтральными и щелочными озёрами.

Форма I РуБисКО



Форма II РуБисКО

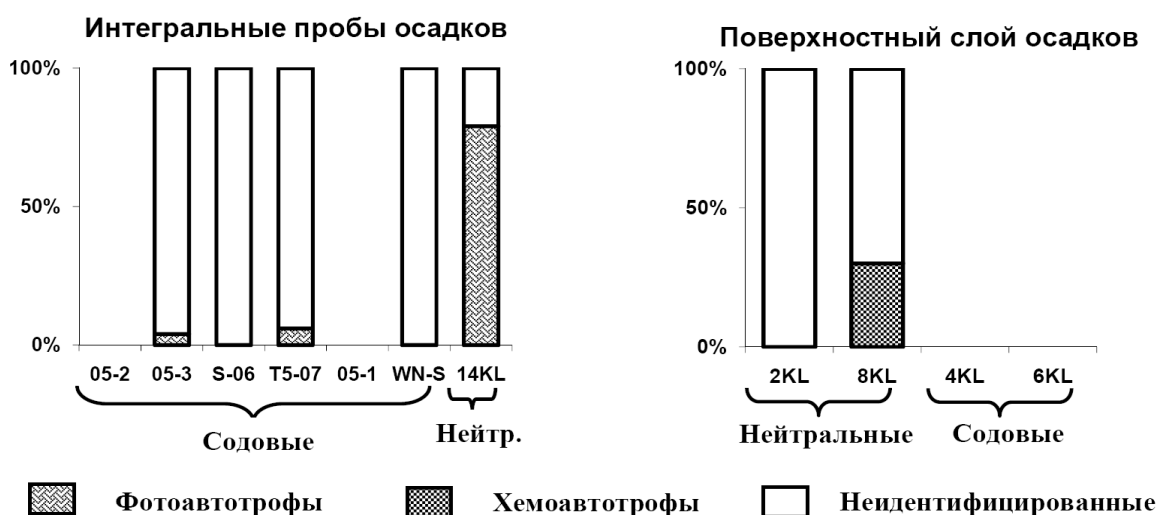


Рис. 9. Вклад фило типов РуБисКО, принадлежащих фото- и хемоавтотрофам, в общее разнообразие автотрофов в осадках содовых и гиперсолёных озёр с нейтральным pH.

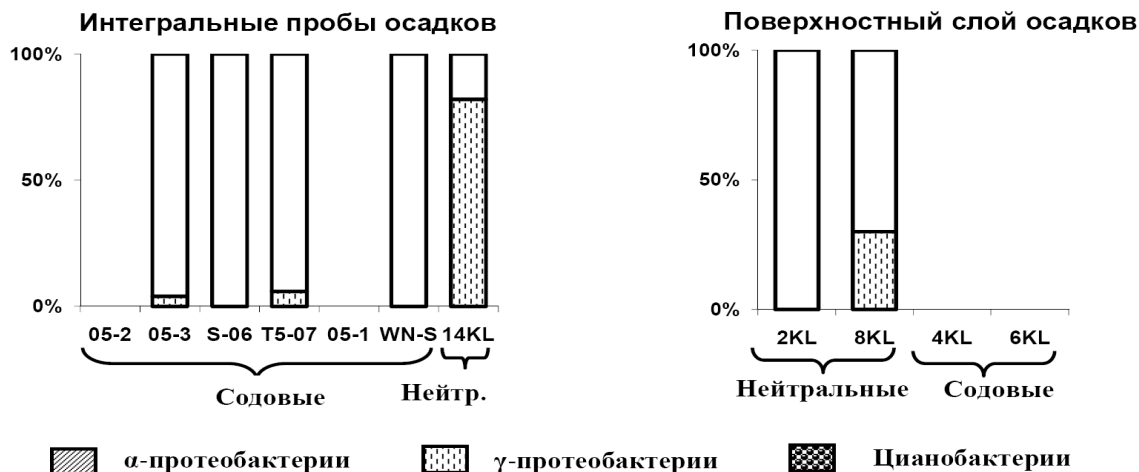
При этом анализ распределения фото- и хемотрофных фило типов в клонových библиотеках выявил различия между образцами интегральных и поверхностных проб (рис. 9). Так, в образцах поверхностных слоёв осадков содовых озёр фототрофные фило типы были доминирующими. В поверхностных слоях гиперсолёных нейтральных озёр фототрофы составляли от 2 до 48% от общего числа клонов. В сравнении с поверхностью, в интегральных пробах преобладали фило типы хемоавтотрофных бактерий.

Несмотря на значительную часть неизвестных филотипов, уже сейчас можно сказать, что большинство последовательностей в обоих типах проб принадлежат микроорганизмам подразделения γ -протеобактерий (рис. 10).

Форма I РуБисКО



Форма II РуБисКО



α -протеобактерии
 γ -протеобактерии
 Цианобактерии
 Неидентифицированные

Рис. 10. Вклад филотипов РуБисКО, принадлежащих протеобактериям и цианобактериям, в общее разнообразие автотрофов в осадках содовых и гиперсолёных озёр с нейтральным pH.

В данной работе также был проведён анализ генов АТФ-зависимой цитратлиазы (*acI*B) в осадках содовых озёр. Праймеры, специфичные для зелёных серных бактерий филы *Chlorobi*, не выявили соответствующих генов ни в одном из образцов, что соответствует данным микробиологических исследований, которые не обнаружили культивируемых представителей зеленых серных бактерий в содовых озерах. Однако с помощью праймеров, специфичных для хемоавтотрофных бактерий, в интегральных пробах из умеренно-солёных озёр (T5-07 и S-06) были обнаружены близкие уникальные филотипы, принадлежащие неизвестным эpsilon-протеобактериям. До настоящего времени в литературе не было сведений о присутствии автотрофных эpsilon-протеобактерий в содовых озёрах, поэтому полученные данные свидетельствуют о необходимости

проведения дальнейших микробиологических исследований по выявлению этих уникальных микроорганизмов.

ВЫВОДЫ

1. Усовершенствованы известные праймерные системы и разработаны новые праймеры для амплификации генов РуБисКО форм I и II у различных бактерий.
2. Определены и включены в международную базу данных GenBank последовательности 101 фрагмента генов, кодирующих РуБисКО формы I и формы II, а также АТФ-цитратлиазы, принадлежащих различным хемо- и фотоавтотрофным бактериям;
3. Проведён филогенетический анализ полученных *de novo* последовательностей, который позволил:
 - выявить особенности эволюции фотоавтотрофных бактерий и предложить схему эволюции генов, кодирующих РуБисКО формы I у фотоавтотрофных бактерий порядка Chromatiales;
 - выявить внутривидовую вариабельность структуры и набора генов РуБисКО у галофильных сероокисляющих бактерий;
4. Показана эффективность использования белок-кодирующих генов для анализа минорных членов микробных сообществ, присутствие которых не всегда обнаруживается анализом генов 16S рРНК (в частности, представителей новых родов хемолитоавтотрофных галофильных СОБ родов *Thiohalorhabdus*, *Thiohalospira*, *Thiohalomonas*, *Thiohalophilus*);
5. Анализ генов РуБисКО в исследованных природных гало(алкало)фильных сообществах выявил доминирование хемотрофных (pp. *Thioalkalivibrio*, *Thiohalorabdus*, *Halothiobacillus*) и фототрофных (p. *Halorhodospira*) гамма-протеобактерий; показаны изменения в распределении филотипов фото- и хемотрофов в направлении от поверхностных слоёв осадков, где преимущественно обнаруживаются фототрофы, до глубинных слоёв, в которых преобладают хемоавтотрофы.
6. Анализ генов РуБисКО и АТФ-зависимой цитратлиазы выявил присутствие в солёных озёрах неизвестных представителей хемоавтотрофных бактерий, в том числе, впервые обнаруженных в некоторых содовых озёрах филотипов ϵ -протеобактерий, что свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения биоразнообразия гало(алкало)фильных экосистем традиционными микробиологическими методами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах:

1. Турова Т.П., Кеппен О.И., Ковалева О.Л., Слободова Н.В., Берг И.А., Ивановский Р.Н. (2009). Филогенетическое положение пурпурной серной

- бактерии *thiocapsa* sp. штамм BBS на основании анализа генов 16s рPHK, *cbbL* и *nifH* и описание его в качестве нового вида *Thiocapsa bogorovii* sp.nov. Микробиология т.78(2): 1-12.
2. Sorokin DY, **Kovaleva OL**, Tourova TP, Muyzer G. (2010). *Thiohalobacter thiocyanaticus* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacterium from hypersaline lakes, that utilizes thiocyanate. Int J Syst Evol Microbiol. 60(Pt 2):444-50.
 3. Sorokin DY, Tourova TP, **Kovaleva OL**, Kuenen JG, Muyzer G. (2010). Aerobic carboxydutrophy under extremely haloalkaline conditions in *Alkalispirillum/Alkalilimnicola* strains isolated from soda lakes. Microbiology, 156(Pt3): 819-27.
 4. Tourova TP, **Kovaleva OL**, Sorokin DY. and Muyzer G. (2010). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes as a functional marker for chemolithoautotrophic halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. Microbiology. 156(Pt7): 2016-25.
 5. И.А. Брянцева, Т.П. Турова, **О.Л.Ковалева**, Н.А. Кострикина, В.М. Горленко (2010). Новая крупная алкалофильная пурпурная серобактерия *Ectothiorhodospira magna* sp. nov. Микробиология, 2010, 6, (в печати).
 6. **Kovaleva Olga L.**, Tatjana P. Tourova, Gerard Muyzer, Tatjana V. Kolganova and Dimitry Y. Sorokin (2010). Diversity of RuBisCO and ATP citrate lyase genes in soda lake sediments. FEMS Microb Ecol (in press). DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.00996.x.

Тезисы конференций:

- 1.**Kovaleva O.L.**, Sorokin D.Y., Turova T.P., Muyzer G. Investigation of autotrophic prokaryotes biodiversity in extremely soda lakes using RuBisCO genes as phylogenetic markers. 3rd Congress of European Microbiologists: «Microbes and Man – interdependence and future challenges», Gothenburg, Sweden, June 28 - July 2, 2009.
- 2.**Ковалева О.Л.**, Сорокин Д.Ю., Турова Т.П. Использование генов РубисКО как филогенетического маркёра для исследования биоразнообразия автотрофных прокариот содовых озёр. Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». Москва, Россия, 24 – 27 декабря, 2009. Материалы симпозиума, с.79.
- 3.**Kovaleva O.L.**, Sorokin D.Y., Turova T.P., Muyzer G. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase as phylogenetic marker for autotrophic bacteria in hypersaline habitats. 9th International conference on halophilic microorganisms “Halophiles 2010”, Beijing, China, June 29 – July 3, 2010.