

УДК 582.232.7: 574.583(282.256.341)

**О.И. БЕЛЫХ, И.В. ТИХОНОВА, Е.Г. СОРОКОВИКОВА,
Т.А. ЩЕРБАКОВА, А.В. КУРЕЙШЕВИЧ**

Лимнологический ин-т СО РАН,
ул. Улан-Баторская, 3, 664033 Иркутск, 33, А/я 278, Россия
e-mail: belykh@lin.irk.ru

Ин-т гидробиологии НАН Украины,
просп. Героев Сталинграда, 12, 04210 Киев, Украина
e-mail: ALischuk@rambler.ru

**ПИКОПЛАНКТОННЫЕ *CYANOPROKARYOTA* РОДОВ
SYNECHOCOCCUS NAGELI И *CYANOBIUM RIPPKA*
ЕТ СОHEN-BAZ. ИЗ ОЗЕРА БАЙКАЛ (РОССИЯ)**

Представлены результаты исследований морфологии и ультраструктуры двух штаммов пикопланктонных *Cyanoprokaryota* (*Cyanophyta*, *Cyanobacteria*), выделенных из прибрежной и глубоководной частей озера Байкал. Определены нуклеотидные последовательности 16S рРНК генов этих штаммов, выявлены особенности их роста в различных условиях среды. На основании полученных данных выделенные пикоцианопрોકариоты отнесены к представителям родов *Synechococcus* Nägeli и *Cyanobium* Riprka et Cohen-Baz. Последний не указывался ранее для оз. Байкал.

Ключевые слова: пикопланктонные *Cyanoprokaryota*, Байкал, 16S рДНК, электронная микроскопия.

Введение

В конце 70-х годов в водах мирового океана были выявлены в большом количестве мельчайшие фототрофные организмы размером 0,2–2,0 мкм, названные автотрофным пикопланктоном (autotrophic picoplankton, APP) (Stockner, Antia, 1986). Исследования показали, что основным компонентом APP в морях являются хроококковые водоросли рода *Synechococcus* (Stockner, Antia, 1986). В пресных водоемах пикопланктонные *Cyanoprokaryota* достигают такой же высокой численности (до 10^6 кл/мл), как и в морских экосистемах, и составляют до 70 % первичной продукции (Stockner, Antia, 1986; Stockner, 1991; Callieri, Stockner, 2002). Однако, несмотря на широкое распространение пикоцианопрોકариот и значительную роль в функционировании водных экосистем, таксономический состав их недостаточно изучен вследствие малых размеров исследуемых объектов, отсутствия клеточных органелл, внутренних и внешних структур, необходимых для идентификации.

© О.И. Белых, И.В. Тихонова, Е.Г. Сорокикова, Т.А. Щербакова,
А.В. Курейшевич, 2011

Морфологическое различие видов основывается только на нескольких признаках и в природных популяциях видовая идентификация пико-цианопрокариот практически невозможна. Как правило, авторы отмечают видовое разнообразие пикопланктона в пресных водах и доминирование *Synechococcus*-подобных цианопрокариот (Stockner, 1991; Callieri, Stockner, 2002).

Первоначально род *Synechococcus* объединял одноклеточные виды с формой клеток от коккоидных до палочковидных, поперечно делящихся в одном направлении, живущих одиночно или в агрегатах (Голлербах и др., 1953). В дальнейшем в классификации бактерий род стали рассматривать как временный “сверхрод”, состоящий из шести кластеров — *Synechococcus*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium* и трех кластеров морских цианобактерий, которые отличались по содержанию ГЦ-пар и местобитанию видов (Waterbury, Rippka, 1989). После пересмотра систематических признаков и ревизии этого “сверхрода” на основе морфологических особенностей и способа деления кластеры *Cyanobium* и *Cyanobacterium* были выделены в отдельные роды. К роду *Cyanobacterium* отнесены виды с диаметром клеток более 3 мкм (Komárek et al., 1999). Сравнительное изучение двух коллекционных штаммов *Synechococcus* и *Cyanobium* позволило детально выявить их цитоморфологические различия (Komárek et al., 1999). *Synechococcus* sp. PCC 6301 характеризуется палочковидной формой клеток, способностью формировать псевдофиламенты и наличием как симметричного, так и асимметричного деления с образованием клеток разных размеров. Типовой штамм рода *Cyanobium* — *C. gracile* Rippka et Cohen-Bazire (PCC 6307) имеет одиночные клетки овальной формы, делящиеся симметрично.

В настоящее время некоторые ранее описанные виды рода *Synechococcus* (*S. plancticus* Drews, Prauser et Uhlmann, *S. rubescens* Chang, *S. virga-rosea* Chang) перенесены в род *Cyanobium* (Komárek, Anagnostidis, 1998; Callieri, Stockner, 2002). Генетические исследования, в частности анализ 16S рДНК, в отличие от морфологических наблюдений, показали невозможность достоверного разделения двух родов, продемонстрировав близкородственные отношения *Synechococcus* и *Cyanobium*. Поэтому было предложено использовать термин “*Synechococcus*-type”, или “*Synechococcus/Cyanobium* кластер” для обозначения пресноводных пикопланктонных изолятов. Известно, что род *Synechococcus* как и другие роды, относящиеся к порядку хроококковых, является полифилетичным (Giovannoni et al., 1988). Представители рода находятся в 4–8 далеко разветвленных (парафилетичных) линиях, которые могут стать в дальнейшем независимыми родами (Honda et al., 1999; Robertson et al., 2001). Вместе с тем, первые результаты молекулярно-филогенетического анализа последовательностей гена 16S рРНК показали, что морские и пресноводные пикопланктонные штаммы формируют устойчивую кладу, расположенную отдельно от других цианопрокариот, включая *Synechococcus* sp. PCC 6301 (Kane et al., 1997; Urbach et al., 1998). В дальнейшем при анализе пресноводных изолятов из различных

водоемов, в т.ч. из олиготрофных субальпийских озер, из крупных озер: Боденского, Бива, Балатона, Верхнего, обнаружено значительное генетическое разнообразие *Synechococcus* spp. и *Cyanobium* spp. Представители обоих родов формировали смешанные кластеры внутри клады пикофитопланкта *sensu* E. Урбах и др. (Urbach et al., 1998; Robertson et al., 2001; Crosbie et al., 2003; Ernst et al., 2003; Ivanikova et al., 2007).

В оз. Байкал автотрофный пикопланктон на 90 % представлен цианопрокариотами, численность которых в продуктивные годы может достигать 2–3 млн кл/мл (Belykh, Sorokovikova, 2003). Первым описанным видом байкальского пикопланктона является эндемичный вид *Synechocystis limnetica* Popovsk. (Поповская, 1991; Поповская, Белых, 2003). Кроме того, *Synechococcus* sp. и *S. elongatus* Nägeli были приведены в списке планктонных водорослей оз. Байкал в 1991 г., однако без детального описания (Поповская, 1991). Подробная характеристика различных морфотипов этого рода *in situ* была получена позднее. В результате многолетних наблюдений установлено, что виды рода *Synechococcus* доминируют по численности и встречаются в озере в течение всех сезонов (Поповская, Белых, 2003; Белых и др., 2007; Belykh, Sorokovikova, 2003). Представители рода *Cyanobium* из Байкала до настоящего времени не описаны, но обнаружены в крупных европейских и североамериканских озерах (Ernst et al., 2003; Crosbie et al., 2003; Quелlette et al., 2006).

Цель данной работы – идентификация и эколого-морфологическая характеристика двух штаммов пикоцианопрокариот, выделенных из прибрежного и глубоководного участков оз. Байкал с помощью микроскопических и молекулярно-биологических методов.

Материалы и методы

Пикопланктонные *Cyanoprokaryota* выделены из проб воды оз. Байкал в августе 1998 г. Штамм ВАС 9803 выделен из поверхностной пробы литоральной зоны Северного Байкала, штамм ВАС 9810 – из пелагиали Южного Байкала с глубины 10 м (максимальная глубина на станции отбора 1400 м).

Для получения культур воду предварительно фильтровали через стерильные фильтры “Millipore” с диаметром пор 3 мкм для удаления микро- и нанопланктона. Затем фильтрат высевали на 1 %-ную агаризованную среду Z-8 с добавлением колхицина (Поповская, Белых, 2003). Культивирование осуществляли в термостате New Brunswick G25 (“Edison”) при освещенности 1000 лк (лампы холодного белого света) и температуре 11–12 °С.

Для изучения морфологии и характера флуоресценции цианопрокариот нефиксированные клетки наблюдали в световом микроскопе Axiovert 200 (“Zeiss”), снабженном ртутной лампой и набором фильтров: G 365, BP 450-490, BP 546/12. Микрофотографии получали с помощью камеры Pixerа Penguin 600CL (“Pixerа”), используя программу Видео

ТесТ-Размер 5.0 (“ВидеоТесТ”). С помощью этой же программы проводили измерение клеток и статистическую обработку результатов. Для сканирующей (СЭМ) и трансмиссионной (ТЭМ) электронной микроскопии препараты готовили по методикам, описанным нами ранее (Гладких и др., 2008; Belykh, Sorokovikova, 2003).

Исследование влияния биогенов и освещенности на ростовые характеристики выделенных штаммов *Cyanoprokaryota* осуществляли культивированием их на жидкой питательной среде. Контрольные культуры выращивали на среде Z-8 при освещенности 1000 лк. Для исследования реакции цианопрокариот на добавки биогенов в среду Z-8 добавляли почвенную вытяжку при освещенности 1000 лк. Для изучения влияния освещенности использовали немодифицированную среду Z-8, освещенность увеличивали до 2000 лк. Показатели роста исследуемых штаммов определяли по измерению (с интервалом 3 сут) оптической плотности культуральной суспензии на спектрофотометре СФ-46 (“Ломо”) при длине волны 750 нм.

Суммарную ДНК выделяли методом ферментативного лизиса с последующей экстракцией фенол-хлороформом. Для амплификации фрагмента гена 16S *r*РНК использовали универсальные бактериальные праймеры F27L (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') и F1350R (5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'). Определение нуклеотидных последовательностей проводили на секвенаторе Beckman CEQ™ 8800 (“Beckman Coulter Inc.”). Хроматограммы обрабатывали с помощью программы Chromas (<http://www.technelysium.com.au>). Полученные и гомологичные последовательности гена 16S *r*РНК цианопрокариот из GenBank выравнивали с помощью ClustalW (Larkin et al., 2007). Филогенетический анализ проводили методами объединения ближайших соседей (NJ, neighbor-joining), максимальной экономии (MP, maximum parsimony) и максимального правдоподобия (ML, maximum likelihood) с помощью программ Mega 4.0 (Tamura et al., 2007) и Phym1 (Guindon, Gascuel, 2003). При построении NJ-древа генетические расстояния между нуклеотидными последовательностями оценивали с помощью двухпараметрической модели Кимуры. MP-древо конструировали методом эвристического поиска с использованием алгоритма обмена ближайших соседей (CNI, Close-Neighbor-Interchange). При ML-анализе использовали GTR модель нуклеотидных последовательностей, рассчитанную по программе Model Generator (Keane et al., 2006).

Статистическую достоверность ветвлений оценивали с помощью бутстреп-анализа (по 1000 псевдореplik). Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами: *Synechococcus* sp. ВАС 9803 – DQ459298, *Cyanobium* sp. ВАС 9810 – DQ459297.

Результаты и обсуждение

Морфология и ультраструктура. Выделенные из оз. Байкал две культуры *Cyanoprokaryota* различались по автофлуоресценции, морфологии и ультраструктуре (рис. 1). Клеточная суспензия ВАС 9803 имела сине-

зеленую окраску, что свидетельствовало о доминировании фикоцианина (ФЦ) в качестве основного светособирающего пигмента. При освещении зеленым светом этот вид проявлял темно-красную флуоресценцию. Клетки имели цилиндрическую форму со слегка закругленными концами. Диаметр их составлял $1,32 \pm 0,18$ мкм ($n = 50$), длина $1,86 \pm 0,31$ мкм ($n = 50$). Встречались также клетки в форме палочки длиной до 4,15 мкм (рис. 1, а). В результате бинарного деления в одной плоскости образовывались две клетки одинаковой или разной длины. В СЭМ наблюдали клетки, обильно покрытые плотной слизью, способствующей образованию крупных конгломератов, характерных для этого штамма (рис. 1, б). При негативном контрастировании (ТЭМ) у клеток не выявлено дополнительных поверхностных структур (рис. 1, в).

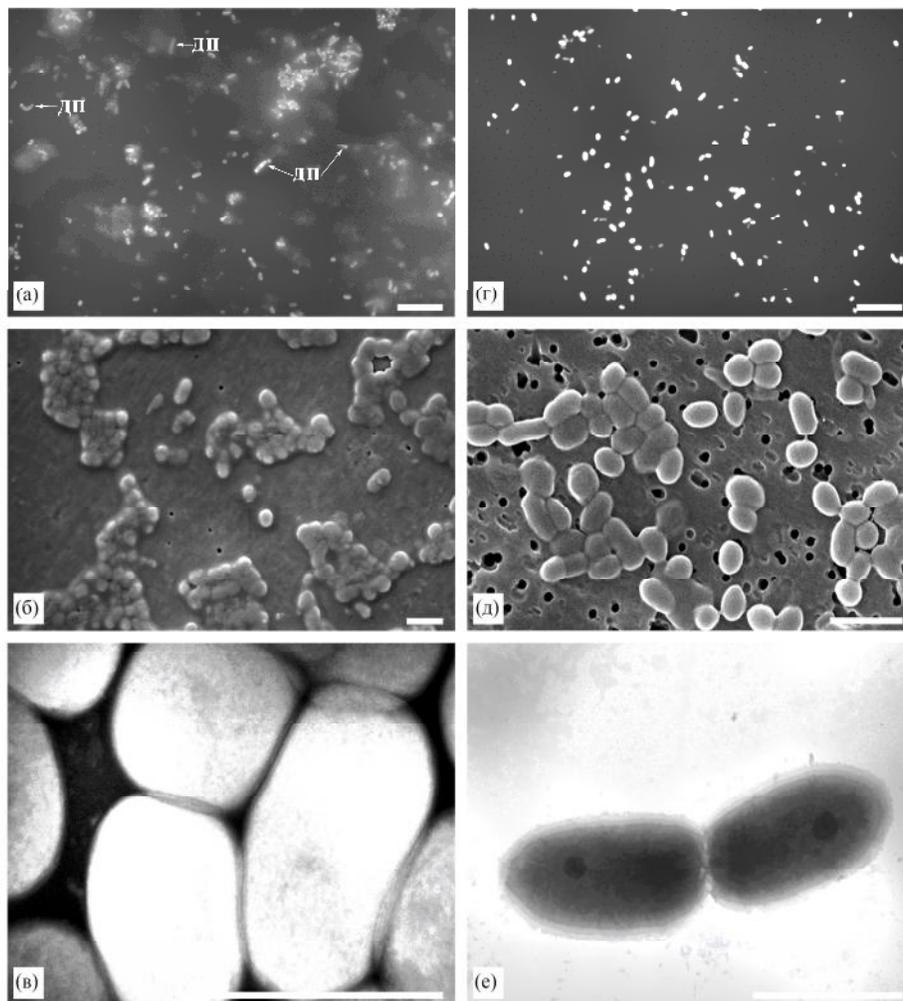


Рис. 1. Морфология байкальских пикоцианопрокариот. а, г – эпифлуоресцентная микроскопия; б, д – СЭМ; в, е – ТЭМ, негативное контрастирование. а–в – *Synechococcus* sp. VAS 9803; г–е – *Cyanobium* sp. VAS 9810. dp – длинные палочки (палочковидная форма клетки). Масштаб: а, г – 10 мкм, б, д – 2 мкм, в, е – 1 мкм

Суспензия культуры ВАС 9810 имела розово-коричневый цвет. При освещении зеленым светом клетки интенсивно флуоресцировали оранжево-красным цветом, что обусловлено высоким содержанием фикоэритрина (ФЭ). Они имели овальную форму, их диаметр составлял $1,36 \pm 0,23$ мкм ($n = 50$), длина — $1,80 \pm 0,33$ мкм ($n = 50$) (рис. 1, *з*). Бинарное деление приводило к образованию двух дочерних клеток одинаковой длины, ассиметричное деление не встречалось (рис. 1, *д*, *е*). При микроскопическом наблюдении штамма ВАС 9810 в препаратах отмечали преимущественно одиночные клетки или по две вместе, реже находили небольшие скопления, крупных конгломератов не обнаружено. Клетки выделяли небольшое количество слизи, при исследовании с помощью СЭМ и ТЭМ характеризовались гладкой поверхностью (рис. 1, *д*, *е*).

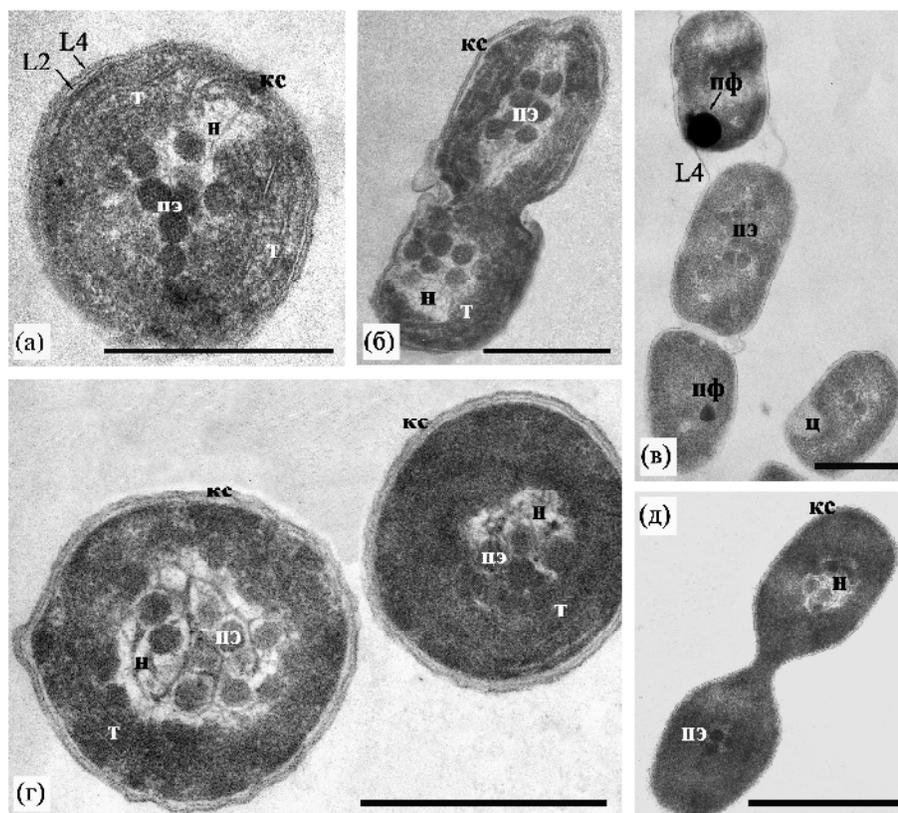


Рис. 2. Ультраструктура байкальских пикоцианопрокариот. *Synechococcus* sp. ВАС 9803: *а* — поперечный срез взрослой клетки; *б* — продольный срез, делящаяся клетки; *в* — молодые клетки в цепочке. *Synechococcus* sp. ВАС 9810: *г* — взрослые клетки, *д* — равномерно делящиеся клетки. Обозначения: т — тилакоиды, н — нуклеоплазма, пэ — полиэдральные тела, пф — полифосфатные гранулы, ц — цианофициновые гранулы, кс — клеточная стенка, L2 — пептидогликановый слой клеточной стенки, L4 — наружная мембрана клеточной стенки. Масштаб 1 мкм

Ультраструктура клеток штамма ВАС 9803 была типичной для хроококковых *Cyanoprokaryota* (рис. 2, а–в). Клеточная стенка четырех-слойная с отчетливым пептидогликановым слоем (L2) и наружной мембраной (L4) (рис. 2, а). После деления в некоторых случаях молодые клетки оставались соединенными друг с другом посредством наружной мембраны, формируя цепочку из нескольких клеток (рис. 2, в). Фотосинтетический аппарат представлен концентрическими тилакоидами, расположенными ближе к периферии клетки. Чаще всего в клетках обнаруживалось по два-три тилакоида (рис. 2, а, б). Цитоплазма умеренно электроплотная у большинства клеток. В области нуклеоида она разрежена и заполнена большим количеством полиэдральных тел, число которых в некоторых клетках достигало 10. Полифосфатные гранулы найдены в виде электроплотных включений разного размера в периферической части клеток. Там же встречались и цианофициновые гранулы (рис. 2, в).

Ультраструктура клеток штамма ВАС 9810 имела некоторые черты строения, сходные с клетками ВАС 9803 (рис. 2, г, д). Клеточная стенка состояла из характерных для цианопрокариот четырех слоев. Толщина ее слегка превышала таковую у штамма ВАС 9803, наружная мембрана имела ровные или слабоволнистые, хорошо очерченные контуры (рис. 2, г). Тилакоиды концентрической формы, расположены по периферии клетки по два-три, внутритилакоидное пространство плотное. Центр клетки занимали полиэдральные тела и нуклеоид, цитоплазма клеток штамма ВАС 9810 более осмиофильная, чем у ВАС 9803, особенно у молодых клеток на стадии деления (рис. 2, д).

Ростовые характеристики. Кривые роста штаммов *Synechococcus* sp. ВАС 9803 и *Cyanobium* sp. ВАС 9810 на различных средах и при разных значениях освещенности приведены на рис. 3. Максимальный рост *Synechococcus* sp. ВАС 9803 наблюдали при освещенности 2000 лк. Во время фазы экспоненциального роста оптическая плотность культуральной суспензии увеличивалась более чем в 10 раз. При добавлении в среду 1 % почвенной вытяжки наблюдался интенсивный рост штамма от момента инокуляции в течение 12 дней, после чего прирост оптической плотности культуральной суспензии уменьшался. В контрольном эксперименте цианопрокариоты росли с меньшей скоростью. После 12 дня с выходом на стационарную фазу роста биомасса оставалась постоянной.

В условиях более высокой освещенности (2000 лк) штамм *Cyanobium* sp. ВАС 9810 рос медленно на протяжении всего периода культивирования. Оптическая плотность культуральной суспензии была примерно в 2 раза ниже, чем в контрольном варианте при освещенности 1000 лк. После 16-го дня культура начинала переходить в стационарную фазу роста. Добавление почвенной вытяжки в среду Z-8 также не оказывало выраженного благоприятного действия на рост цианопрокариот этого вида, замедление роста отмечалось уже после 16-го дня эксперимента.

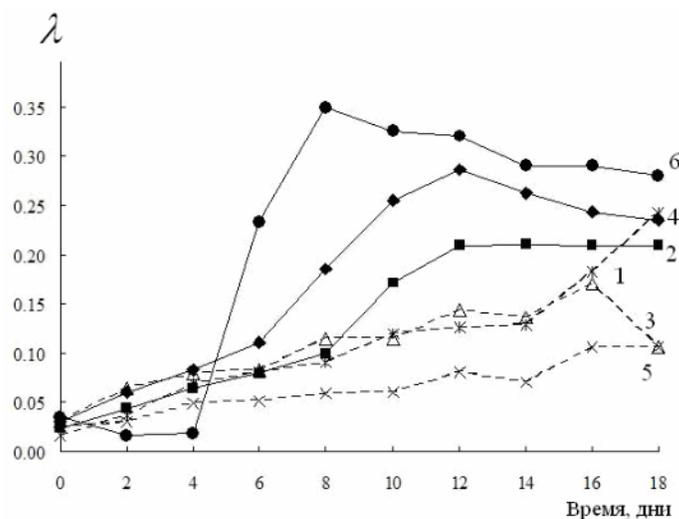


Рис. 3. Оптическая плотность суспензии клеток () штаммов *Synechococcus* sp. ВАС 9803 и *Cyanobium* sp. ВАС 9810 в процессе роста на различных средах и при различной освещенности: 1, 3, 5 – *Cyanobium* sp. ВАС 9810; 2, 4, 6 – *Synechococcus* sp. ВАС 9803. 1, 2 – контроль (Z-8, 1000 лк); 3, 4 – Z-8 с добавлением 1 % почвенной вытяжки, 1000 лк; 5, 6 – Z-8, 2000 лк

Анализ генов 16S рРНК. В результате секвенирования фрагмента гена 16S рРНК байкальских штаммов ВАС 9810 и ВАС 9803 определены последовательности длиной 1195 пар нуклеотидов. Расшифрованные гены сходны между собой на 97 %, их различают 28 позиций, из них – семь неоднозначно определенных нуклеотидов, семь одиночных вставок/делений, остальные – одиночные и парные замены.

Поиск 100 максимально сходных записей в базе нуклеотидных последовательностей GenBank проводили с помощью программы BLAST с установленными параметрами. По результатам поиска, 7 % составляют последовательности штаммов *Synechococcus* и *Cyanobium*, содержащие максимальное число (98 %) идентичных нуклеотидов, остальные со сходством не менее 96 %. Предварительный анализ этих наборов последовательностей (дерево не приведено) показал, что изоляты, образуя отдельную “байкальскую” кладу (100 % бутстреп-значение), группируются (93 %) с представителями пресноводных пикоцианопротокариот из водоемов разной трофности и локализации. В дальнейшем из этого набора последовательностей в филогенетический анализ выбраны данные по морфологически охарактеризованным (культурируемым) штаммам, к которым добавлены последовательности типовых и референтных штаммов родов *Synechococcus* и *Cyanobium* (Kane et al., 1997; Urbach et al., 1998; Honda et al., 1999; Robertson et al., 2001; Crosbie et al., 2003; Ernst et al., 2003), штаммов из крупных древних озер. В качестве внешней группы в выборку были включены представители рода *Microcystis*.

Применение разных методов филогенетического анализа к этому набору генов 16S рРНК показало, что пикопланктонные представители цианопрокариот формируют устойчивые группы, имеющие значимые поддержки на NJ, MP и ML древах (рис. 4). В кладе пикопланктона (100/99/94) *sensu* E. Урбах и др. (Urbach et al., 1998) представители родов *Cyanobium* и *Synechococcus*, включая байкальские штаммы, образуют несколько хорошо поддержанных групп. Мы выделяем семь групп в пикопланктонной кладе, обозначенных на древе буквами А-Г, многие из которых отмечены и охарактеризованы другими авторами (Kane et al., 1997; Robertson et al., 2001; Crosbie et al., 2003; Ernst et al., 2003). Последовательности изолятов *Synechococcus* из термальных источников (PCC 6717, 6716, *S. elongatus* 'Togaу') и референтных штаммов *S. elongatus* (PCC 6301, 7942) составили отдельные группы непикопланктонных представителей этого рода, "I" и "K" соответственно.

Одна из наиболее постоянных в кладе пикопланктона – группа "А" (99/88/100), т.н. *Cyanobium gracile*-кластер *sensu* А. Эрнст и др. (Ernst et al., 2003), образованный типовым штаммом *C. gracile*, но содержащий также штаммы *Synechococcus*. Здесь представлены изоляты из пресных и солоноватых водоемов.

Кластер из оз. Бива "С" неустойчив (распадается в MP и NJ реконструкциях, но имеет значимую поддержку в ML – 70 %). Его основу составляет клада (100/99/98) штаммов PS 717, PS 723, PS 721. Положение второй клады описанных первыми изолятов оз. Бива – LBG3 и LBG2 (Kane et al., 1997) нестабильно. Тем не менее, это часто распознаваемый кластер (Robertson et al., 2001; Crosbie et al., 2003; Ernst et al., 2003). Пикопланктонные изоляты из озер Австрии, Германии, Швейцарии, Италии и оз. Бива с *Cyanobium rubescens* представляют субальпийский кластер "D" (93/82/97). Морские *Synechococcus* традиционно составляют отдельную ветвь "Е" (95/75/100). *Synechococcus*-подобные штаммы из соленых озер Антарктиды и сборная группа пресноводных *Synechococcus* из альпийских и арктических озер, в т.ч. *S. nidulans* (группа I, Crosbie et al., 2003), входят в группы "G" (84/70/100) и "F" (99/75/100), соответственно. Байкальские изоляты обнаруживаются в составе "пресноводной" клады "В" (74/60/73). Эта группа разнородна в таксономическом, экологическом, географическом отношении. Здесь представлены штаммы родов *Synechococcus* и *Cyanobium* из водоемов, разных по гидрологическим и трофическим условиям, география которых охватывает три материка. Байкальские пикоцианопрокариоты формируют отдельную линию (79–90 %). Их ближайшими родственниками являются *Synechococcus*-изоляты из альпийского оз. Мондзее, мезотрофного оз. Бива, оз. Тусуланъярве, болотистого водоема в Японии, *Cyanobium* sp. из мелкого водоема Италии, а также штамм из оз. Эри.

На основании особенностей морфологии и ультраструктуры клеток выделенные из оз. Байкал *Cyanoprokaryota* отнесены к порядку *Chroococcales* (Komárek, Anagnostidis, 1998). Штамм ВАС 9803 по морфологическим признакам принадлежит роду *Synechococcus*, ВАС 9810 – роду *Cyanobium*. Репродукция обоих байкальских штаммов происходит типичным для этих родов бинарным делением в одном направлении.

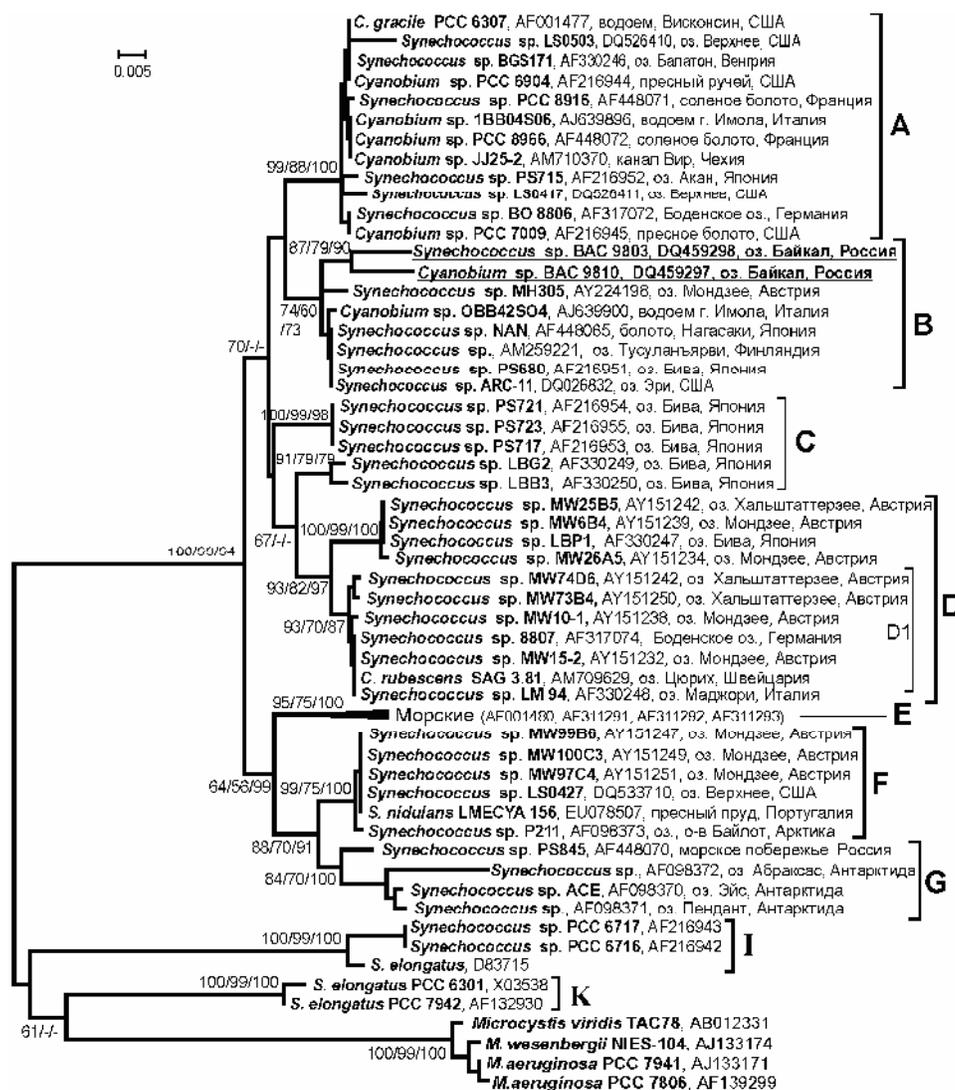


Рис. 4. Филогенетическое древо цианопрокаркыот, основанное на результатах сравнения последовательностей 16S рДНК, построенное методом ближайших соседей (NJ). Цифрами обозначены результаты бутстреп-анализа для деревьев, построенных различными методами (NJ/MP/ML). Подчеркнуты последовательности, полученные в данной работе. Буквами обозначены кластеры: А – *Cyanobium gracile* – кластер; В – пресноводные цианопрокаркыоты; С – штаммы оз. Бива; D – субальпийский кластер I (D1 – группа изолятов только из альпийских озер); E – истинно морские цианопрокаркыоты; F – группа I (Crosbie et al., 2003); G – антарктические штаммы; I – штаммы *Synechococcus* из термальных источников; K – непланктонные пресноводные штаммы *Synechococcus*. А–G – клада пикопланктона

Для представителей рода *Synechococcus* характерна форма клеток от цилиндрической до удлинённо-палочковидной, иногда слегка изогнутой. Клетки обычно остаются после деления в парах. Наличие ас-

симметричного деления наблюдается только у видов этого рода (Komárek, Anagnostidis, 1998; Komárek et al., 1999). “Истинные” *Synechococcus* отличаются от *Synechococcus*-подобных видов способностью не-которых клеток увеличиваться в длину (Komárek et al., 1999). Появление удлиненных палочковидных клеток отмечено в условиях повышенной температуры и интенсивности света (Jezberová, Komárková, 2007a).

Наиболее близким видом по фенотипическим признакам для штамма *Synechococcus* ВАС 9803 является *S. nidulans* Pringsh. (Kom.), который встречается в планктоне мелких пресных водоемов во всем мире (Komárek, Anagnostidis, 1998). В настоящее время известно несколько штаммов этого рода, включая *S. nidulans* ЛМЕСУА (Португалия), последовательность гена 16S РНК которого определена. Как следует из проведенного нами филогенетического анализа, эти два вида сильно удалены друг от друга, располагаясь в разных кластерах, “В” и “F”, соответственно (см. рис. 4).

В культуре штамма *Cyanobium* sp. ВАС 9810 клетки делятся симметрично на две дочерние клетки одинакового размера и имеют овальную форму, которая отмечается и у типового вида *C. gracile*, однако последний имеет меньшие размеры. В целом видам рода *Cyanobium* свойственна форма клеток от овальной до коротко-палочковидной (Komárek et al., 1999). По размеру клеток байкальский *Cyanobium* sp. наиболее сходен с эпифитным видом *C. diatomicola* Geitl.

Ультратонкое строение клеток байкальских изолятов характерно для пикоцианопротокариот (Stockner, Antia, 1986; Maeda et al., 1992; Komárek et al., 1999). Пристеночная локализация тилакоидов у обоих штаммов отличает их от представителей близких родов *Cyanobacterium* с продольным и *Cyanothece* – радиальным расположением мембран (Komárek et al., 1999). Исследованные нами штаммы не имеют дополнительных поверхностных структур, таких как S-слой, найденный у изолятов из Боденского озера (Callieri, Stockner, 2002), и спинов, которые описаны для некоторых морских и пресноводных видов *Synechococcus* (Stockner, Antia, 1986; Jezberová, Komárková, 2007b). Образование спинов, как показали исследования, – непостоянный признак. Они появлялись только в присутствии флагоеллят – одних из основных потребителей пикопланктона (Jezberová, Komárková, 2007b). Характерный признак исследуемых штаммов – большое количество полиэдральных тел, в которых локализуется фермент рибулозодифосфат-карбоксилаза.

Synechococcus sp. ВАС 9803 является ФЦ-штаммом, а *Cyanobium* sp. ВАС 9810 – ФЭ-штаммом. Таким образом, полученные нами культуры представляют собой оба пигментных типа пикоцианопротокариот, встречающихся в пресных водах (фикоцианин- и фикоэритрин-доминирующие). В отличие от крупноклеточных *Cyanoprokaryota*, которые могут значительно изменять соотношение фикобилиптеинов (ФЦ и ФЭ) при различных условиях светового режима, у пресноводных пикоцианопротокариот такой способности не выявлено: в зависимости от штамма у них преобладает ФЦ- или ФЭ-тип (Ernst et al., 2003).

Известно, что ФЭ-цианопрокариоты доминируют в олиготрофных водах (Stockner, 1991; Vörös et al., 1998; Callieri, Stockner, 2002; Belykh, Sorokovikova, 2003), а ФЦ-цианопрокариоты – в высокопродуктивных водоемах и заливах с высоким содержанием биогенов (Vörös et al., 1998; Katano et al., 2005). Повышенная концентрация фосфора и низкая прозрачность в месте впадения р. Баргузин в оз. Байкал благоприятны для роста ФЦ-*Cyanoprokaryota* (Katano et al., 2005). В экспериментах показано, что ФЦ-цианопрокариоты растут лучше при освещении длинноволновым светом, а ФЭ-цианопрокариоты имеют высокую скорость деления, когда преобладают коротковолновые лучи. Поэтому в глубинных слоях воды дополнительным пигментом у *Cyanoprokaryota* чаще всего является фикоэритрин, способный эффективно улавливать свет короткой длины волны (Callieri, Stockner, 2002).

Наши исследования показали, что ФЦ-доминирующий *Synechococcus* ВАС 9803 положительно реагирует как на добавление биогенов в среду, так и на увеличение освещенности, а *Cyanobium* ВАС 9810 лучше растет на слабоминерализованной среде и в условиях низкой освещенности.

Байкальские штаммы, выделенные из местообитаний, различающихся по целому ряду признаков, отличаются пигментным составом и экологией. *Synechococcus* sp. ВАС 9803 получен из пробы воды, отобранной в Северном Байкале вблизи устья р. Рель, несущей в оз. Байкал большое количество биогенов, когда прозрачность воды по диску Секки составляла 7,2 м (Белых и др., 2007). Штамм *Cyanobium* sp. ВАС 9810 выделен из пробы, отобранной в пелагиали Южного Байкала на глубине 10 м, где осредненная проникающая солнечная радиация составляла 2–5 % от падающей на поверхность (Довгий, 1977). В августе в пелагиали озера наблюдалась максимальная численность ФЭ-пикоцианопрокариот (Belykh, Sorokovikova, 2003). В Байкале, как и в других глубоководных олиготрофных водоемах, в связи с вертикальным ослаблением падающей солнечной радиации на глубине наблюдается резкое изменение спектрального состава вошедшего в воду излучения, при котором сильно ослабляется длинноволновая часть спектра (Довгий, 1977). В этом случае наиболее успешно развиваются ФЭ-пикоцианопрокариоты, которые также менее требовательны к содержанию биогенов. В глубоководной части озера во время летнего пика численности пикоцианопрокариот концентрация фосфора и азота снижается практически до нуля (Белых и др., 2007).

Морфологические и физиологические различия двух байкальских штаммов, их принадлежность к близкородственным родам поддерживаются генетической дистанцией, разделяющей их – 2,3 % замен на неполной последовательности малой субъединицы рибосомного гена. Соответствует ли это уровню замен между родами циано прокариот – определить трудно. Известны только оценки генетических отличий по гену 16S рРНК, касающиеся распознавания видов. Так, из данных о ДНК-ДНК гибридизации (Stackebrandt, Goebel, 1994) следует, что 2,5 %

означает принадлежность последовательностей к разным видам (хотя обратное не всегда верно). Ранее было показано, что дивергенция штаммов на 1 % нуклеотидных замен в том же маркерном гене позволяет распознавать их как отдельные виды (Stackebrandt, Ebers, 2006). Таким образом, 2,3 % замен, разделяющих байкальские штаммы, соответствуют, по меньшей мере, межвидовым различиям.

Анализ разных наборов генов 16S рРНК, включающих расшифрованные последовательности, несколькими методами определения филогенетических взаимоотношений показал сходные результаты в отношении исследованных штаммов: байкальские изоляты неизменно участвуют в образовании группы пресноводных пикоциано прокариот (“В”, рис. 4), входящей в кладу пикофитопланктона *sensu* E. Урбах и др. (Urbach et al., 1998). Внутри “пресноводной” клады штаммы ВАС 9803 и ВАС 9810 достоверно формируют монофилетическую группу, образующую отдельную от других видов *Synechococcus* и *Cyanobium* ветвь. Взаимоотношения близкородственных морфологически установленных родов *Synechococcus* и *Cyanobium* генетически противоречивы. Это видно по составу клад многих филогенетических древ (Robertson et al., 2001, Crosbie et al., 2003, Ernst et al., 2003, см. рис. 4), где объединение штаммов происходит по экологической, географической (или другой неявной) принадлежности, но в нарушение таксономических взаимоотношений. Так, в субальпийском кластере “D”, в кладе “D1”, объединяющей изоляты *Synechococcus* только из альпийских озер, находятся хорошо изученные морфологически виды *Cyanobium rubescens*, и *Synechococcus* ВО 8807. Впервые описанный кластер *Cyanobium gracile* (A) (Ernst et al., 2003) наряду с типовым штаммом *C. gracile* PCC 6307 содержит штаммы *Synechococcus*. Таким образом, монофилетичность новых изолятов, принадлежащих разным родам, с одной стороны, может быть артефактом малого числа байкальских последовательностей, с другой — еще одним свидетельством полифилетичности родов *Synechococcus* и *Cyanobium*, которые не являются филогенетически валидными таксонами (Honda et al., 1999; Robertson et al., 2001; Ernst et al., 2003).

Synechococcus- и *Cyanobium*-подобные цианопрокариоты представляют генетически диверсифицированные группы. Виды *Synechococcus* располагаются в пяти далеко дивергировавших линиях цианопрокариот вместе с представителями других родов (Robertson et al., 2001). Тем не менее, последовательности новых охарактеризованных штаммов или природных изолятов часто формируют собственные группы, не связанные ни с одной из этих линий (Ernst et al., 2003; Crosbie et al., 2003). Клонированные штаммы *Synechococcus* spp. из пелагиали оз. Верхнее формируют две собственные линии на филограммах последовательностей генов 16S рРНК и *rbcL*, не группируясь ни с одним из известных кластеров пресноводных *Synechococcus*, тогда как в прибрежной части озера доминируют повсеместно распространенные виды *Synechococcus* (Ivanikova et al., 2007). По мнению этих

авторов, появление новых экотипов вызвано особенностями температурного и светового режимов пелагиали, а также низким содержанием биогенов и железа. В нашем случае оба штамма, один из которых обитает в литоральной зоне, а другой в глубоководной пелагиали оз. Байкал, генетически обособлены от представителей “пресноводной” клады “В” из других водоемов, что, видимо, отражает специализацию этих организмов к уникальным условиям прибрежной и пелагической зон ультраолиготрофного и холодно водного оз. Байкал.

Дальнейший анализ большего числа геномных последовательностей охарактеризованных клонов *Synechococcus/Cyanobium* spp. пикопланктонной фракции байкальской воды, взятой с разных глубин и участков акватории озера, необходим для установления филогении представителей сообщества, освоивших многообразие ниш Байкала.

Заключение

Комплексное исследование методами световой и электронной микроскопии, молекулярной биологии изолированных из прибрежной и глубоководной зон оз. Байкал двух штаммов пикопланктонных *Cyanoprokaryota* показало, что они принадлежат двум разным родам — *Synechococcus* и *Cyanobium*. Последний ранее не указывался для озера Байкал. Изоляты имеют свои морфологические, физиологические и генетические особенности в связи с разными условиями обитания. По данным анализа фрагмента последовательностей рибосомного гена, штаммы ВАС9803 и ВАС9810 образуют отдельную кладу среди ближайших родственников — пресноводных цианопрокариот из географически отдаленных водоемов.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 10–04–01613а, № 09–04–90420 Укр_а и МК–1239.2010.4 и в рамках проекта ЛИН СО РАН № 01201052128. Авторы выражают благодарность Н.Л. Бельковой за обсуждение материалов статьи.

Белых О.И., Помазкина Г.В., Тихонова И.В., Томберг И.В. Характеристика летнего фитопланктона и автотрофного пикопланктона озера Байкал в 2005 г. // Альгология. – 2007. – 17, № 3. – С. 380–396.

Гладких А.С., Белых О.И., Клименков И.В., Тихонова И.В. Азотфиксирующая цианобактерия *Trichormus variabilis* в фитопланктоне озера Байкал // Микробиология. – 2008. – 77. – С. 814–822.

Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. Синезеленые водоросли. – М.: Сов. наука, 1953. – 652 с.

Довгий Т.Н. Подводная солнечная радиация на Байкале. – Новосибирск: Наука, 1977. – 103 с.

Поповская Г.И. Фитопланктон Байкала и его многолетние изменения (1958–1990): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Новосибирск, 1991. – 32 с.

Поповская Г.И., Белых О.И. Этапы изучения автотрофного пикопланктона оз. Байкал // Гидробиол. журн. – 2003. – 39. – С. 12–24.

- Belykh O.I., Sorokovikova E.G. Autotrophic picoplankton in Lake Baikal: abundance, dynamics and distribution // AEHM. – 2003. – 3. – P. 251–261.
- Callieri C., Stockner J.G. Freshwater autotrophic picoplankton: a review // J. Limnol. – 2002. – 61, N 1. – P. 1–14.
- Crosbie N., P ckl M., Weisse T. Dispersal and phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria, inferred from 16S *r*RNA gene and *cpcBA*-intergenic spacer sequence analyses // AEM. – 2003. – 69. – P. 5716–5721.
- Ernst A., Becker S., Wollenzien U.I., Postius C. Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S *r*RNA and ITS-1 sequence analysis // Microbiology (UK). – 2003. – 149. – P. 217–228.
- Giovannoni S.J., Turner S., Olsen G.J. *et al.* Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts // J. Bacteriol. – 1988. – 170. – P. 3584–3592.
- Guindon S., Gascuel O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood // Syst. Biol. – 2003. – 52. – P. 696–704.
- Honda D., Yokota A., Sugiyama J. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on 16S *r*RNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains // J. Mol. Evol. – 1999. – 48. – P. 723–739.
- Ivanikova N.V., Popels L.C., Michael L.R., Bullerjahn G.S. Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton // AEM. – 2007. – 73. – P. 4055–4065.
- Jezberová J., Komárková J. Morphological transformation in a freshwater *Cyanobium* sp. induced by grazers // Environ. Microbiol. – 2007a. – 9. – P. 1858–1862.
- Jezberová J., Komárková J. Morphometry and growth of three *Synechococcus*-like picoplanktic cyanobacteria at different culture conditions // Hydrobiologia. – 2007b. – 578. – P.17–27.
- Kane M., Maeda H., Fukunaga T., Nishi K. Molecular phylogenetic relationship between strains of cyanobacterial picoplankton in Lake Biwa, Japan // J. Mar. Biotech. – 1997. – 5. – P. 41–45.
- Katano T., Nakano S., Ueno H. *et al.* Abundance, growth and grazing loss rates of picophytoplankton in Barguzin Bay, Lake Baikal // Aquat. Ecol. – 2005. – 39. – P. 431–439.
- Keane T.M., Creevey C.J., Pentony M.M. *et al.* Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified // BMC Evol. Biol. – 2006. – 6. – P. 29.
- Komárek J., Anagnostidis K. *Cyanoprokaryota*. 1. Teil: *Chroococcales* // Süßwasserflora von Mitteleuropa. – Jena, etc.: G. Fischer, 1998. – Bd. 19/1. – 548 p.
- Komárek J., Kopecký J., Cepák V. Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus* // Cryptogamie, Algal. – 1999. – 20. – P. 209–222.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P. *et al.* CLUSTALW and CLUSTALX // Bioinformatics. – 2007. – 23. – P. 2947–2948.
- Maeda H., Kawai A., Tilzer M. The water bloom of cyanobacterial picoplankton in Lake Biwa // Hydrobiologia. – 1992. – 248. – P. 93–103.
- Ouellette A., Handy S., Wilhelm S. Toxic *Microcystis* is widespread in Lake Erie: PCR detection of toxic genes and molecular characterization of associated cyanobacterial communities // Microbiol. Ecol. – 2006. – 51. – P. 154–165.
- Robertson B., Tezuka N., Watanabe M. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (Cyanobacteria) using sequences of 16S *r*DNA and part of the phycocyanin operon

- reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content // Int ern. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – **51**. – P. 861–871.
- Stackebrandt E., Ebers J.* Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards // Microbiol. Today. – 2006. – **33**. – P. 152–155.
- Stackebrandt E., Goebel B.M.* Taxonomic note: a place for DNA: DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology // Int ern. J. Syst. Bacteriol. – 1994. – **44**. – P. 846–849.
- Stockner J.G.* Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems: the view from the summit // Intern. Rev. Ges. Hydrobiol. – 1991. – **76**. – P. 483–492.
- Stockner J.G., Antia N.J.* Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective // Can. J. Fish. Sci. – 1986. – **43**. – P. 2472–2503.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol. – 2007. – **24**. – P. 1596–1599.
- Urbach E., Scanlan D.J., Distel D.L. et al.* Rapid diversification of marine picophytoplankton with dissimilar light-harvesting structures inferred from sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria) // J. Mol. Evol. – 1998. – **46**. – P. 188–201.
- Vörös L., Callieri C., Balogh K.V., Bertoni R.* Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range // Hydrobiologia. – 1998. – **369-370**. – P. 117–125.
- Waterbury J.B., Rippka R.* Subsection 1. Order *Chroococcales* Wettstein 1924, emend. Rippka et al., 1979 // Bergey's manual of systematic bacteriology. – Baltimore: Williams, Wilkins, 1989. – P. 1728–1746.

Получена 06.10.09

Рекомендовал к печати А.В. Гончаров

O.I. Belykh, I.V. Tikhonova, E.G. Sorokovikova, T.A. Sherbakova, A.V. Kureishevich

Limnological Institute of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
3, Ulan-Batorskaya St., 664033 Irkutsk, Russia

Institute of Hydrobiology, National Academy of Sciences of Ukraine
12, Prosp. Geroev Stalingrada St., 04210 Kiev, Ukraine

PICOPLANKTON *CYANOPROKARYOTA* OF GENERA *SYNECHOCOCCUS* NÄGELI AND *CYANOBIUM* RIPPKA ET COHEN-BAZ. FROM LAKE BAIKAL

Morphology and ultrastructure of two strains of picoplanktonic *Cyanoprokaryota* (*Cyanophyta*, Cyanobacteria) isolated from the littoral and deepwater areas of Lake Baikal were studied with epifluorescence and electron microscopy. Nucleotide sequences of 16S rRNA genes of these strains were analyzed. Peculiar features of strains' growth under different environmental conditions were revealed. As a result, isolated picocyanoprokaryota were referred to genera *Synechococcus* Nägeli и *Cyanobium* Rippka et Cohen-Baz. The latter have not been recorded in Lake Baikal.

Keywords: picoplanktonic *Cyanoprokaryota*, Lake Baikal, 16S rRNA, electron microscopy.