

Первая находка почвенной цианобактерии *Nodosilinea epilithica* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) в России

А. Д. Темралеева, С. А. Дронова

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
ул. Институтская, д. 2, г. Пушкино, Московская обл., 142290, Россия;
temraleeva.anna@gmail.com

Резюме. *Nodosilinea epilithica* Perkerson et Casamatta впервые приводится для территории России. Вид обнаружен в фоновой каштановой почве в зоне сухих степей (Волгоградская область). Определение подтверждено с помощью морфологического и молекулярно-генетического анализа. Характерной особенностью изученного штамма является способность формировать узелки в условиях нормальной освещенности ($60\text{--}75 \mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Предполагается, что количество узелков может быть связано с возрастом цианобактериальной культуры.

Ключевые слова: цианобактерии, *Nodosilinea*, новая находка, морфология, 16S рРНК, каштановая почва, сухие степи, Волгоградская область.

First record of the soil cyanobacterium *Nodosilinea epilithica* (*Synechococcales*, *Cyanobacteria*) in Russia

A. D. Temraleeva, S. A. Dronova

Institute of Physico-Chemical and Biological Problems in Soil Science of RAS,
Institutskaya Str., 2, Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia;
temraleeva.anna@gmail.com

Abstract. *Nodosilinea epilithica* Perkerson et Casamatta is reported for the first time for Russia. The sample was isolated from a typical chestnut soil in the zone of dry steppes (Volgograd Region) and its identity was confirmed by morphological and molecular analyses. The specific feature of the studied strain is its ability to form nodules at normal ($60\text{--}75 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$) light. The number of nodules is supposed to be related to the age of a cyanobacterial culture.

Keywords: cyanobacteria, *Nodosilinea*, new record, morphology, 16S rRNA, chestnut soil, zone of dry steppes, Volgograd Region.

Введение

Род цианобактерий *Nodosilinea* Perkerson et Casamatta был выделен из полифилетичного рода *Leptolyngbya* Anagnostidis et Komárek и описан на основании морфологического и молекулярно-генетического анализа (Perkerson *et al.*, 2011). Представители рода принадлежат к порядку *Synechococcales*, семейству *Leptolyngbyaceae* Komárek, Kastovsky, Mares et Johansen (Komárek *et al.*, 2014). Виды *Nodosilinea* характеризуются следующими морфологическими признаками: уни-

кальной способностью формировать узелки (nodules), нитчатой организацией таллома, наличием тонкого, мягкого и бесцветного чехла, париетальным расположением тилакоидов. Нити неподвижные с неявной или отчетливой перешнуровкой, клетки изодиаметрические или вытянутые, аэротопы отсутствуют. Некоторые виды способны к азотфиксации. Размножение гормогониями или с помощью некридий. По литературным данным, все известные виды способны формировать узелки в условиях низкой освещенности: 4–6 мкмоль фотонов · м⁻² · с⁻¹ и ниже (Li, Brand, 2007; Perkerson *et al.*, 2011). В настоящее время в состав рода включают 4 вида (Guiry, Guiry, 2016), характеристика которых приведена ниже.

N. nodulosa (Li et Brand) Perkerson et Casamatta [≡ *Leptolyngbya nodulosa* Li et Brand] — номенклатурный тип названия рода *Nodosilinea* — принадлежит к морским цианобактериям. Характеризуется распростертыми нитями с цилиндрическими клетками 1.2–1.4 мкм дл. и 1.1–1.5 мкм шир. Размножение фрагментацией трихомов в местах расположения некридий и гормогониями (Li, Brand, 2007). От остальных видов отличается преимущественно изодиаметрическими клетками. Референсный штамм: *N. nodulosa* UTEX 2910. Изолирован из пробы морской воды, взятой на глубине 10 м (Южно-Китайское море).

N. bijugata (Kongisser) Perkerson et Kováčik [≡ *Phormidium bijugatum* Kongisser; ≡ *Leptolyngbya bijugata* (Kongisser) Anagnostidis et Komárek] — пресноводный вид. Нити неветвящиеся, формируют узелки редко, чехлы часто отсутствуют (если присутствуют, то тонкие и бесцветные). Трихомы слегка перешнурованные. Гормогонии, некридии и меристематические зоны отсутствуют. Клетки цилиндрические, часто с 1–2 гранулами у перегородок, изодиаметрические или вытянутые, 1.5–6.2 мкм дл. и 1.5–1.7 мкм шир. Терминальные клетки закругленные, удлинённые. Париетальное расположение тилакоидов плохо различимо в световой микроскоп. От остальных видов отличается отсутствием некридий и меристематических зон. Референсный штамм: *N. bijugata* Kováčik 1986/5a. Изолирован на литорали озера (Польша).

N. conica Perkerson et Johanansen и *N. epilithica* Perkerson et Casamatta являются наземными видами. *N. conica* отличается от остальных видов рода более широкими трихомами и коническими клетками. Нити неразветвленные, узелки образуются редко. Чехлы мягкие, тонкие, бесцветные. Трихомы слегка перешнурованные, без некридий, есть меристематические зоны и гормогонии. Трихомы на концах суженные. Париетальное расположение тилакоидов отчетли-

во заметно в световом микроскопе. Клетки изодиаметрические или более короткие, 0.9–2.4 мкм дл. и 2.5–2.7 мкм шир. Терминальные клетки в зрелых трихомах конической формы. Референсный штамм: *N. conica* SEV4-5-c1. Изолирован из почвы пустыни (США).

N. epilithica близок по морфологии к *N. nodulosa*, но отличается более широкими трихомами. Узелки наблюдаются часто. Нити обычно неветвящиеся, редко с ложным ветвлением. Чехлы тонкие, бесцветные, иногда расширяющиеся и расплывающиеся. Трихомы 1.5–2.5 мкм шир., слегка или отчетливо перешнурованные, некридии и меристематические зоны отсутствуют. Размножение гормогониями. Клетки обычно бочонковидные, 1.0–8.0 мкм дл., часто с 1–2 гранулами в центроплазме. Терминальные клетки закругленные, сходные по морфологии с интеркалярными. Референсный штамм: *N. epilithica* Kovácsik 1998/7. Изолирован из зеленой бактериальной пленки на стене дома (Италия).

Таким образом, разделение видов основано на таких морфологических признаках, как размеры клеток, степень перешнуровки трихомов, форма терминальных клеток, а также особенностях размножения (фрагментация трихомов, гормогонии).

В России представители рода *Nodosilinea* были найдены в Кулундинских степных содовых озерах с высокой щелочностью (рН до 10.3) и соленостью до 200 г/л (Samylyna *et al.*, 2014). Вид *N. bijugata* (как *Phormidium bijugatum* и *Leptolyngbya bijugata*) неоднократно приводился для водных и наземных экосистем страны (Patova, 1995; Yaruslina *et al.*, 2004; Komulaynen *et al.*, 2006; Bioraznoobrazie..., 2010; Федоров, 2011; Shargaeva *et al.*, 2012; и др.). Однако молекулярно-генетическое подтверждение находок было получено только в первой из цитированных работ (Samylyna *et al.*, 2014). Информация же о находках вида *N. epilithica* в России отсутствует. Данная работа представляет собой первое описание, основанное на морфологическом и молекулярно-генетическом изучении коллекционного штамма.

Материал и методы

Изоляция и культивирование штамма. Объектом исследования послужил штамм ACSSI 34 из альгологической коллекции Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ИФХиБПП) (Algal Collection of Soil Science Institute, ACSSI). Штамм был изолирован авторами из верхнего горизонта А1 фоновой каштановой почвы (Волгоградская область, Россия, зона сухих степей). Географические координаты места пробоотбора: 47°53'21" с. ш., 44°0'50" в. д. Культивирование штамма проводили на среде

BG11 с азотом (1%-ный агар, pH = 7.0) в климатостате (температура +23–25 °С, освещенность люминесцентными лампами FLUORA 60–75 мкмоль фотонов · м² · с⁻¹, фотопериод 12 ч).

Микроскопия. Морфологию и жизненный цикл штамма ACSSI 34 изучали методами световой микроскопии (светлое поле и интерференционный контраст) с помощью микроскопов Leica DM750 и Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) в ЦКП ИФХиБПП. Результаты наблюдений документированы рабочими рисунками и фотографиями, снятыми с помощью цветных цифровых камер «Видеозавр» (Россия) и Carl Zeiss MRc 5 (Германия). Сроки наблюдения за штаммом составляли от 2 недель до 4 месяцев.

Выделение, амплификация, очистка и секвенирование ДНК. ДНК выделяли из цианобактериальной биомассы с помощью набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США), следуя протоколу производителя. При амплификации использовали готовую смесь для ПЦР Screen Mix-HS (Евроген, Россия). Праймеры и условия для амплификации гена 16S рРНК указаны в таблице 1 (Flechtner *et al.*, 2002; Strunecský *et al.*, 2010). Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini (Евроген, Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО «Синтол» (Россия).

Молекулярно-филогенетический анализ. Для молекулярно-филогенетического анализа была составлена выборка последовательностей гена 16S рРНК, принадлежащих некультивируемым образцам из природной среды и культивируемым штаммам рода *Nodosilinea* (табл. 2). В выборку включены таксоны, имеющие ≥ 97 % сходства по алгоритму BLAST с последовательностью гена 16S рРНК исследуемого штамма и длину последовательности целевого фрагмента не менее 1300 пар нуклеотидов (п. н.). Согласно требованию к длине последовательностей из набора данных были исключены короткие нуклеотидные последовательности *Nodosilinea* sp. FI2-2HA2 (HM018678), *Nodosilinea epilithica* Kovácik 1990/52 (HM018679), *Leptolyngbya* sp. Kovácik 1986/5a (EU528669), *Leptolyngbya* sp. NB1a-A5 (EU528666), *Leptolyngbya* sp. NB1b-A5 (EU528668), *Leptolyngbya* sp. SEV4-5-c1 (EU528667) и *Leptolyngbya* sp. Rehakova 1960/20 (DQ085091), использованные в работе Perkerson с соавт. (Perkerson *et al.*, 2011). В качестве внешней группы были выбраны представители других родов того же семейства *Leptolyngbyaceae*: *Halomicroneta* и *Prochlorothrix*. Суммарно в выборку вошли 64 нуклеотидные последовательности, выравнивание которых выполнили в программе

BioEdit по алгоритму ClustalW. Общая длина последовательностей для дальнейшего анализа составила 1427 п. н. Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Оптимальной для исследуемого набора данных стала модель GTR+I+G. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстреп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями гомологичных генов охарактеризовали с помощью генетических дистанций. Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выровненных последовательностей, вычисление которого проводили в программе MEGA 5.0.

Таблица 1

Праймеры и условия амплификации фрагмента гена 16S рРНК

Primers and amplification conditions for 16S rRNA gene analysis

Праймер Primer	Последовательность (5'–3') Sequence (5'–3')	Условия амплификации Amplification conditions
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	94 °C — 5 min; 94 °C — 45 sec, 54 °C — 45 sec, 72 °C — 2 min, 35 cycles; 72 °C — 7 min
CYA781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCCAT	
359F	GGGGGATTTCCGCAATGGG	94 °C — 5 min; 94 °C — 1 min, 59 °C — 1 min, 72 °C — 2 min, 35 cycles; 72 °C — 5 min
1467R	AAGGAGGTGATCCAGCCACA	

Таблица 2

Выборка таксонов цианобактерий рода *Nodosilinea* для 16S рРНК-анализа

Dataset of *Nodosilinea* taxa for 16S rRNA analysis

Название таксона в GenBank Taxon name in GenBank	Штамм Strain	Номер в GenBank GenBank Accession number	Среда обитания, место изоляции Habitat	Источник Reference
<i>Nodosilinea epilithica</i>	Kováčik 1998/7*	HM018677	Зеленая пленка на стене дома, Италия Green biofilm on the wall of the house, Italy	Perkerson <i>et al.</i> , 2011
<i>Leptolyngbya</i> sp.	Kováčik 1999/1	GQ495618	Зеленая пленка на стене церкви, Словакия Green biofilm from interior church wall, Slovakia	—

Продолжение табл. 2

Название таксона в GenBank Taxon name in GenBank	Штамм Strain	Номер в GenBank GenBank Accession number	Среда обитания, место изоляции Habitat	Источник Reference
<i>Pseudanabaena-ceae</i> цианобактериум	DPG1-KK5	EF654067	Почва, США Soil, USA	Siegismund <i>et al.</i> , 2008
<i>Phormidium</i> sp.	SAG 61.90	EU624415	Река Мёз, Бельгия Meuse River, Belgium	–
<i>Oscillatoriales</i> цианобактериум	EcFYyyy400	KC463194	Почва, Южная Африка Soil, South Africa	Dojani <i>et al.</i> , 2014
<i>Leptolyngbya subtilissima</i>	EcFYyyy700	KC463197	Почва, Южная Африка Soil, South Africa	Dojani <i>et al.</i> , 2014
<i>Phormidium</i> sp.	195-A12	EU282429	Сибирская вечная мерзлота, Колыма, Россия Siberian permafrost, Kolyma River, Russia	–
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07080	HM217085	Эстуарии, Португалия Estuaries, Portugal	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07298	HM217044	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07314	HM217061	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07309	HM217053	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07084	HM217072	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07296	HM217082	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 06069	HM217073	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012e
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07091	HM217068	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07311	HM217056	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07088	HM217064	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Leptolyngbya</i> sp.	LEGE 07312	HM217066	Там же Same	Lopes <i>et al.</i> , 2012
<i>Nodosilinea nodulosa</i> (T)	UTEX 2910*	KF307598	Южно-Китайское море South China Sea	Li, Brand, 2007
<i>Leptolyngbya</i> sp.	0BB24S04	AJ639893	Пруд, Италия Pond, Italy	Castiglioni <i>et al.</i> , 2004
<i>Leptolyngbya</i> sp.	0BB19S12	AJ639895	Там же Same	Castiglioni <i>et al.</i> , 2004

Продолжение табл. 2

Название таксона в GenBank Taxon name in GenBank	Штамм Strain	Номер в GenBank GenBank Accession number	Среда обитания, место изоляции Habitat	Источник Reference
<i>Leptolyngbya</i> sp.	0BB32S02	AJ639894	Там же Same	Castiglioni <i>et al.</i> , 2004
<i>Leptolyngbya</i> sp.	0BB30S02	AJ639892	Там же Same	Castiglioni <i>et al.</i> , 2004
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA167	KC695860	Почва, мангровые экосистемы, Бразилия Soil, mangrove ecosystems, Brazil	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA147	KC695841	Там же Same	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA183	KC695874	Там же Same	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA144	KC695838	Там же Same	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA137	KC695831	Перифитон, мангровые экосистемы, Бразилия Periphyton, mangrove ecosystems, Brazil	Silva <i>et al.</i> , 2014
<i>Leptolyngbya</i> sp.	PCC7104	AB039012	Почва около береговой линии, США Soil near shoreline, USA	–
<i>Leptolyngbya margaretheana</i>	1T12	FR798934	Биопленка в фонтане, Италия Biofilm in a fountain, Italy	Cuzman <i>et al.</i> , 2010
Uncultured <i>Nodosilinea</i> sp.	clone TPB_GMAT_SPRING12_36	HF677144	Микробный мат, Индия Microbial mat, India	–
<i>Leptolyngbya</i> cf. <i>halophila</i>	LEGE 06152	HQ832915	Песчано-каменистый пляж, Португалия Sandy-stony beach, Portugal	–
Uncultured cyanobacterium	clone UMAB-cl-62	FN811246	Почва, Земля Александра I, Антарктика Soil, Alexander I Island, Antarctica	Chong <i>et al.</i> , 2012
Uncultured bacterium	clone GBI-89	GQ441269	Морские микробные маты песчаного пляжа, Нидерланды Marine microbial mats from a sandy beach, Netherlands	–
Uncultured bacterium	clone GBI-83	GQ441263	Там же Same	–

Продолжение табл. 2

Название таксона в GenBank Taxon name in GenBank	Штамм Strain	Номер в GenBank GenBank Accession number	Среда обитания, место изоляции Habitat	Источник Reference
Uncultured bacterium	clone GBII-35	GQ441307	Там же Same	–
Uncultured bacterium	clone GBII-15	GQ441289	Там же Same	–
Uncultured bacterium	clone GBII-24	GQ441296	Там же Same	–
Uncultured cyanobacterium	clone LiUU-11-427.2	HQ386384	Озеро, Швеция Lake, Sweden	–
<i>Oscillatoria neglecta</i>	IAM M-82, NIES-2116	AB003168	Пресноводный, Япония (?) Freshwater, Japan (?)	Honda <i>et al.</i> , 1999
Uncultured <i>Leptolyngbya</i> sp.	clone EHFS1_S05b	EU071483	Чистые комнаты Европейского космического научно-технического центра ESTEC, Голландия Clean rooms of European Space Research and Technology Centre (ESTEC), Netherlands	–
<i>Nodosilinea</i> cf. <i>nodulosa</i>	LEGE 10377	JQ927349	Морские губки, Португалия Marine sponges, Portugal	–
<i>Leptolyngbya antarctica</i>	ANT.LAC.1	AY493588	Бентосные озерные микробные маты, Антарктида Benthic lacustrine microbial mats, Antarctica	Taton <i>et al.</i> , 2006
Uncultured cyanobacterium	clone Alchichica_AL31_2_1B_140	JN825335	Щелочное озеро, Мексика Alkaline lake, Mexico	Couradeau <i>et al.</i> , 2011
Uncultured cyanobacterium	clone Alchichica_AL67_2_1B_202	JN825336	Там же Same	Couradeau <i>et al.</i> , 2011
Uncultured cyanobacterium	clone T-05_20	KP793943	Гейзер, Чили Geyser, Chile	–
Uncultured cyanobacterium	clone T-05_10	KP793940	Там же Same	–
Uncultured cyanobacterium	clone T075-A_1	KP793930	Там же Same	–
Uncultured cyanobacterium	clone T-05_9	KP793939	Там же Same	–
Uncultured bacterium	clone DP10.3.47	FJ612388	Озеро, Китай Lake, China	–

Продолжение табл. 2

Название таксона в GenBank Taxon name in GenBank	Штамм Strain	Номер в GenBank GenBank Accession number	Среда обитания, место изоляции Habitat	Источник Reference
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA515	KF246482	Щелочное озеро, Бразилия Alkaline lake, Brazil	Andreote <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA523	KF246490	Там же Same	Andreote <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA512	KF246481	Там же Same	Andreote <i>et al.</i> , 2014
<i>Nodosilinea</i> sp.	CENA522	KF246489	Там же Same	Andreote <i>et al.</i> , 2014
<i>Leptolyngbya</i> sp.	KIOST-1	JX401929	Озеро, Южная Корея Lake, South Korea	–
Uncultured cyanobacterium	clone R8-R56	DQ181691	Микробный мат из озера, Антарктида Microbial mat from lake, Antarctica	–
Uncultured cyanobacterium	clone A132	DQ181668	Там же Same	–
<i>Nodosilinea bijugata</i>	ПАСС 8602	KF770966	Река, Болгария River, Bulgaria	–
Uncultured bacterium	clone SINH475	HM128037	Гипергалинное озеро, Китай Hypersaline lake, China	Zhang <i>et al.</i> , 2013
Uncultured bacterium	clone GBII-87	GQ441350	Микробный мат с песчаного пляжа, Нидерланды Microbial mat from sandy beach, Netherlands	–
<i>Nodosilinea epilithica</i>	ACSSI 34	–	Каштановая почва, Волгоградская обл., Россия Chestnut soil, Volgograd Region, Russia	Ориг. Original
<i>Halomicronema excentricum</i> (T)	TFEP1*	AF320093	Микробный мат из пруда, Израиль Microbial mat from a pond, Israel	Abed <i>et al.</i> , 2002
<i>Prochlorothrix hollandica</i> (T)		AJ007907	–	–
<i>Prochlorothrix hollandica</i> (T)		AF132792	–	–

Примечание. (T) — типовой вид рода, * — аутентичный штамм; прочерк (–) означает отсутствие данных.

Note. (T) — type species of the genus, * — authentic strain; dash (–) — missing data.

Результаты и обсуждение

Nodosilinea epilithica Perkerson et Casamatta, 2011, *J. Phycol.* 47(6): 1397.

Морфология штамма ACSSI 34. Нити длинные, прямые, часто с плотно свернутыми, компактными или рыхлыми, диффузно переплетенными узелками (табл. I, *a, b*). В основном нити одиночные, редко скрученные друг вокруг друга в виде жгутов (табл. I, *c, d*). Ветвление не отмечено. Чехлы тонкие, бесцветные, иногда расширяющиеся и расплывающиеся. Размножение гормогониями, которые свободно выходят из открытых на концах чехлов (табл. I, *e*). Обычно в одном чехле присутствует один, иногда два трихома. Трихомы 1.5–2.0 мкм шир., отчетливо перешнурованные, некридии и меристематические зоны отсутствуют. Клетки бочонковидные, как правило, до 3.0 мкм дл., часто с 1 или 2 гранулами у поперечных перегородок (табл. I, *f*). Терминальные клетки закругленные, сходные по морфологии с интеркалярными. Колонии ярко-сине-зеленого цвета, плохо снимаются с поверхности агара.

Интересной особенностью данного штамма явилась способность образовывать узелки в условиях нормальной освещенности (60–75 мкмоль фотонов · м⁻² · с⁻¹), в то время как ранее описанные штаммы формировали узелки при низкой освещенности: 4–6 мкмоль фотонов · м⁻² · с⁻¹ и ниже (Li, Brand, 2007; Perkerson *et al.*, 2011), причем при перемещении их в условия с освещенностью 60 мкмоль фотонов · м⁻² · с⁻¹ узелки исчезали в течение 1–2 недель (Li, Brand, 2007). По нашим наблюдениям, возможно, количество узелков связано не с уровнем освещенности, а с возрастом цианобактериальной культуры. Так, узелки встречались единично в молодой двухнедельной культуре, но их количество значительно увеличивалось в старой культуре (3 месяца и более). Функция этих структур до сих пор не установлена, но одним из предположений было их участие в азотфиксации (Li, Brand, 2007). Этой ролью узелков может объясняться увеличение их количества при длительном культивировании цианобактериального штамма, когда запасы доступного азота в культуральной среде исчерпаны. Гипотеза требует дальнейшего подтверждения.

Молекулярно-филогенетический анализ рода Nodosilinea. Все культивируемые штаммы и некультивируемые цианобактерии из образцов окружающей среды, предварительно отобранные из генетического банка данных, образовали монофилетичную кладу с максимальной статистической поддержкой (рис.). Таксономически она была отнесена к роду *Nodosilinea*, в который вошли цианобактерии,

первоначально описанные как виды родов *Leptolyngbya*, *Phormidium* Kütz. ex Gomont, *Oscillatoria* Vaucher ex Gomont и собственно *Nodosilinea*. Значительная часть нуклеотидных последовательностей клады принадлежала к так называемым некультивируемым цианобактериям из природных проб. Однако большинство исследователей, как правило, и не пытаются выделить микроорганизмы из таких образцов, используя для определения таксономического разнообразия метод клоновых библиотек или метагеномный анализ и *a priori* определяя их как некультивируемые. В случае с *Nodosilinea* выделение и культивирование штаммов не вызывает трудностей: цианобактерии легко переходят из субстрата в накопительные смешанные культуры, а затем в монокультуры на питательных средах (Z-8, BG11). Несмотря на то что представители рода широко распространены в экосистемах всего земного шара (табл. 2), формирование внутри клады групп в зависимости от среды обитания и географического распространения цианобактерий не наблюдалось. Тем не менее, отметим, что многие штаммы *Nodosilinea* были изолированы из щелочных и соленых условий.

По данным анализа 16S рПНК гена исследуемый штамм являлся представителем рода *Nodosilinea*, внутри которого устойчиво группировался с аутентичным штаммом *N. epilithica* (рис.). Генетические различия между штаммом ACSSI 34 и *N. epilithica* Kovácsik 1998/7 составили всего 0.4 %, в то время как с другими штаммами *Nodosilinea* — от 1.1 до 3.9 %. В целом, внутри рода генетические различия варьировали до 6.3 %. Межродовые генетические дистанции были на уровне 6.6–8.6 % при сравнении сестринских видов родов *Nodosilinea* и *Halomicronema*, 8.0–9.9 % при сравнении *Nodosilinea* и *Prochlorothrix*, 9.1–9.2 % при сравнении видов *Prochlorothrix* и *Halomicronema*. Уровень генетических различий внутри рода *Nodosilinea* позволяет прогнозировать большой потенциал для открытия новых видов. Об этом же косвенно свидетельствует эврибионтность представителей рода, которые были изолированы из проб воздуха, пресных и морских вод, почвенных образцов и аэрофитных субстратов различных стран (табл. 2). Но, так как основная доля штаммов на филогенетическом дереве рода не объединялась в группы с высокой или умеренной статистической поддержкой, можно предположить, что для установления видовых границ следует использовать более вариабельный, чем ген 16S рПНК, молекулярный маркер, например регион 16S–23S ITS (Perkerson *et al.*, 2011). Однако следует подчеркнуть, что выбор маркера для молекулярно-генетической идентификации организмов в первую очередь определяется воз-

можно сравнить собственные данные с референсными нуклеотидными последовательностями, т. е. наличием выбранных генов или спейсеров в генетических базах данных.



Рис. Укорененное филогенетическое дерево цианобактерий рода *Nodosilinea*, построенное методом максимального правдоподобия (ML), на основе последовательностей гена 16S рРНК (1427 п. н.).

Примечание. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны бутстреп-значения ML; значения < 70 % не показаны. Модель нуклеотидных замен: GTR+I+G. **Жирным шрифтом** выделены типовые виды, звездочкой (*) — аутентичные штаммы.

The rooted phylogenetic tree of *Nodosilinea* cyanobacterial genus constructed by maximal likelihood method (ML) based on 16S rRNA gene sequence data (1427 bp).

Note. Node support of the tree is given as ML bootstrap values; values < 70 % are not shown. Model of nucleotide changes is GTR+I+G. Type species are marked by a **bold font**, authentic strains — by an asterisk (*).

Заключение

Сравнительный анализ последовательностей фрагмента гена 16S рРНК подтвердил принадлежность штамма ACSSI 34 к виду *N. epilithica*. По морфологии изученный штамм не отличался от аутентичного штамма *N. epilithica* Kovácsik 1998/7, но был способен формировать узелки в условиях нормальной освещенности (60–75 мкмоль фотонов · м⁻² · с⁻¹). При этом количество узелков значительно увеличивалось в старой культуре (3 месяца и более). Этот факт, возможно, связан с участием узелков в азотфиксации, но требует дальнейшего подтверждения. Таким образом, впервые на территории России был обнаружен вид *N. epilithica*, изолированный из фоновой каштановой почвы Волгоградской области. Также это вторая находка представителей рода *Nodosilinea* в России, достоверно подтвержденная и морфологическим, и молекулярно-генетическим анализом.

Благодарности

Авторы выражают признательность к. б. н., с. н. с. лаборатории археологического почвоведения ИФХиБПП М. В. Ельцову за организацию полевой экспедиции и помощь в отборе почвенных проб.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60020 мол_а_дк.

Литература

- Abed R. M. M., Garcia-Pichel F., Hernández-Mariné M. 2002. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of Halomicronema excentricum gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 177: 361–370.
- Andreote A. P. D., Vaz M. G. M. V., Genuário D. B., Barbiero L., Rezende-Filho A. T., Fiore M. F. 2014. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *J. Phycol.* 50: 675–684. doi: 10.1111/jpy.12192
- Anagnostidis K., Komárek J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. / Algal. Stud.* 80: 327–472.
- [Биоразнообразие...] *Биоразнообразие водных и наземных экосистем бассейна реки Кожьм (северная часть национального парка «Югыд ва»*). 2010. Сыктывкар: 192 с.
- Castiglioni B., Rizzi E., Frosini A., Sivonen K., Rajaniemi P., Rantala A., Mugnai M. A., Ventura S., Wilmotte A., Boutte C., Grubisic S., Balthasart P., Consolandi C., Bordoni R., Mezzelani A., Battaglia C., De Bellis G. 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7161–7172.

- Chong C. W., Convey P., Pearce D. A., Tan I. K. P. 2012. Assessment of soil bacterial communities on Alexander Island (in the maritime and continental Antarctic transitional zone). *Polar. Biol.* 35: 387–399. doi: 10.1007/s00300-011-1084-0
- Couradeau E., Benzerara K., Moreira D., Gérard E., Kaźmierczak J., Tavera R., López-García P. 2011. Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One.* 6(12): e28767. doi: 10.1371/journal.pone.0028767
- Cuzman O. A., Ventura S., Sili C., Mascalchi C., Turchetti T., D'Acqui L. P., Tiano P. 2010. Biodiversity of phototrophic biofilms dwelling on monumental fountains. *Microb. Ecol.* 60: 81–95.
- Dojani S., Kauff F., Weber B., Büdel B. 2014. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria in biological soil crusts of the Succulent Karoo and Nama Karoo of southern Africa. *Microb. Ecol.* 67: 286–301.
- [Fedorov] Федоров В. Г. 2011. О цианобактериях водоемов Омской области. *Альманах современной науки и образования.* 8(51): 102–107.
- Flechtner V. R., Boyer S. L., Johansen J. R., DeNoble M. L. 2002. *Spirirestis rafaেলensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia.* 74: 1–24.
- Guiry M. D., Guiry G. M. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Honda D., Yokota A., Sugiyama J. 1999. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Evol.* 48(6): 723–739.
- Komárek J., Kašťovský J., Mareš J., Johansen J. R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia.* 86: 295–335.
- [Komulaunpén *et al.*] Комулайнен С. Ф., Чекръжева Т. А., Вислянская И. Г. 2006. *Альгофлора озер и рек Карелии. Таксономический состав и экология.* Петрозаводск: 81 с.
- Li Z., Brand J. 2007. *Leptolyngbya nodulosa* sp. nov. (Oscillatoriaceae), a subtropical marine cyanobacterium that produces a unique multicellular structure. *Phycologia.* 46(4): 396–401.
- Lopes V. R., Ramos V., Martins A., Sousa M., Welker M., Antunes A., Vasconcelos V. M. 2012. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Mar. Environ. Res.* 73: 7–16. doi: 10.1016/j.marenvres.2011.10.005
- [Patova] Патова Е. Н. 1995. *Почвенные азотфиксирующие водоросли в фитоценозах Большеземельской тундры.* Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: 21 с.
- Perkerson R. B. III, Johansen J. R., Kováčik L., Brand J., Kašťovský J., Casamatta D. A. 2011. A unique pseudanabaenalean (cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J. Phycol.* 47(6): 1397–1412. doi: 10.1111/j.1529-8817.2011.01077.x
- Samylina O. S., Sapozhnikov F. V., Gainanova O. Yu., Ryabova A. V., Nikitin M. A., Sorokin D. Yu. 2014. Algo-bacterial communities of the Kulunda steppe (Altai Region, Russia) Soda Lakes. *Microbiol.* 83(6): 849–860. doi: 10.1134/S0026261714060162

- [Shargaeva *et al.*] Шаргаева О. В., Цыренова Д. Д., Бархутова Д. Д. 2012. Разнообразие цианобактерий гидротерм Баунтовской группы (Северное Забайкалье). *Актуальные аспекты современной микробиологии: Сборник тез. VIII Молодежной школы-конф. с междунар. участием*. М.: 96–98.
- Siegesmund M. A., Johansen J. R., Karsten U., Friedl T. 2008. *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *J. Phycol.* 44: 1572–1585. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00604.x
- Silva C. S. P., Genuário D. B., Vaz M. G. M. V., Fiore M. F. 2014. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 100–112.
- Strunecký O., Elster J., Komárek J. 2010. Phylogenetic relationships between geographically separate Phormidium cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? *Polar Biol.* 33: 1419–1428. doi: 10.1007/s00300-010-0834-8
- Taton A., Grubisic S., Ertz D., Hodgson D. A., Piccardi R., Biondi N., Tredici M. R., Mainini M., Losi D., Marinelli F., Wilmotte A. 2006. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *J. Phycol.* 42: 1257–1270. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x
- [Yarushina *et al.*] Ярушина М. И., Танаева Г. В., Еремкина Т. В. 2004. *Флора водорослей водоемов Челябинской области*. Екатеринбург: 308 с.
- Zhang R., Wu Q., Piceno Y. M., Desantis T. Z., Saunders F. M., Andersen G. L., Liu W. T. 2013. Diversity of bacterioplankton in contrasting Tibetan lakes revealed by high-density microarray and clone library analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86(2): 277–287. doi: 10.1111/1574-6941.12160

References

- Abed R. M. M., Garcia-Pichel F., Hernández-Mariné M. 2002. Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 177: 361–370.
- Andreote A. P. D., Vaz M. G. M. V., Genuário D. B., Barbiero L., Rezende-Filho A. T., Fiore M. F. 2014. Nonheterocytous cyanobacteria from Brazilian saline-alkaline lakes. *J. Phycol.* 50: 675–684. doi: 10.1111/jpy.12192
- Anagnostidis K., Komárek J. 1988. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol. / Algal. Stud.* 80: 327–472.
- Bioraznoobrazie vodnykh i nazemnykh ekosistem basseyna reki Kozhym (severnaya chast natsionalnogo parka «Yugyd-va»)* [Biodiversity of water and terrestrial ecosystems of Kozhym River basin (northern part of National Park «Jugyd Va»)]. 2010. Syktyvkar: 192 p. (In Russ.).
- Castiglioni B., Rizzi E., Frosini A., Sivonen K., Rajaniemi P., Rantala A., Mugnai M. A., Ventura S., Wilmotte A., Boutte C., Grubisic S., Balthasart P., Consolandi C., Bordoni R., Mezzelani A., Battaglia C., De Bellis G. 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7161–7172.

- Chong C. W., Convey P., Pearce D. A., Tan I. K. P. 2012. Assessment of soil bacterial communities on Alexander Island (in the maritime and continental Antarctic transitional zone). *Polar. Biol.* 35: 387–399. doi: 10.1007/s00300-011-1084-0
- Couradeau E., Benzerara K., Moreira D., Gérard E., Kaźmierczak J., Tavera R., López-García P. 2011. Prokaryotic and eukaryotic community structure in field and cultured microbialites from the alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS One.* 6(12): e28767. doi: 10.1371/journal.pone.0028767
- Cuzman O. A., Ventura S., Sili C., Mascaldi C., Turchetti T., D'Acqui L. P., Tiano P. 2010. Biodiversity of phototrophic biofilms dwelling on monumental fountains. *Microb. Ecol.* 60: 81–95.
- Dojani S., Kauff F., Weber B., Büdel B. 2014. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria in biological soil crusts of the Succulent Karoo and Nama Karoo of southern Africa. *Microb. Ecol.* 67: 286–301.
- Fedorov V. G. 2011. O tsianobakteriyakh vodoemov Omskoy oblasti [Cyanobacteria of waterbodies of the Omsk Region]. *Almanakh sovremennoy nauki i obrazovaniya.* 8(51): 102–107. (In Russ.).
- Flechtner V. R., Boyer S. L., Johansen J. R., DeNoble M. L. 2002. *Spirirestis rafaelsenis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia.* 74: 1–24.
- Guiry M. D., Guiry G. M. 2016. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>
- Honda D., Yokota A., Sugiyama J. 1999. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequences of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol. Evol.* 48(6): 723–739.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J. R. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia.* 86: 295–335.
- Komulainen S. F., Chekryzheva T. A., Visljanskaja I. G. 2006. *Algoflora ozer i rek Karelii. Taksonomicheskij sostav i ekologiya* [Algoflora of Karelian lakes and rivers. Taxonomy and ecology]. Petrozavodsk: 81 p. (In Russ.).
- Li Z., Brand J. 2007. *Leptolyngbya nodulosa* sp. nov. (Oscillatoriaceae), a subtropical marine cyanobacterium that produces a unique multicellular structure. *Phycologia.* 46(4): 396–401.
- Lopes V. R., Ramos V., Martins A., Sousa M., Welker M., Antunes A., Vasconcelos V. M. 2012. Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Mar. Environ. Res.* 73: 7–16. doi: 10.1016/j.marenvres.2011.10.005
- Patova E. N. 1995. *Pochvennyye azotfiksiruyushchie vodorosli v fitotsenozakh Bolshezemelskoy tundry.* Avtoref. kand. diss. [The soil nitrogen-fixing algae in the phytocenoses of the Bolshezemelskaya tundra. Abstr. Cand. Diss.]. St. Petersburg: 21 p. (In Russ.).
- Perkerson R. B. III, Johansen J. R., Kováčik L., Brand J., Kaštovský J., Casamatta D. A. 2011. A unique pseudanabaenalean (cyanobacteria) genus *Nodosilinea* gen. nov. based on morphological and molecular data. *J. Phycol.* 47(6): 1397–1412. doi: 10.1111/j.1529-8817.2011.01077.x

- Samylyna O. S., Sapozhnikov F. V., Gainanova O. Yu., Ryabova A. V., Nikitin M. A., Sorokin D. Yu. 2014. Algo-bacterial communities of the Kulunda steppe (Altai Region, Russia) Soda Lakes. *Microbiol.* 83(6): 849–860. doi: 10.1134/S0026261714060162
- Shargaeva O. V., Tsyrenova D. D., Barkhutova D. D. 2012. The diversity of the Bauntovsky group (Northern Transbaikal) hydrotherms cyanobacteria *Aktualnye aspekty sovremennoy mikrobiologii: Sbornik tezisov VIII Molodezhnoy shkoly-konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem*. Moscow: 96–98. (In Russ.).
- Siegesmund M. A., Johansen J. R., Karsten U., Friedl T. 2008. Coleofasciculus gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *J. Phycol.* 44: 1572–1585. doi: 10.1111/j.1529-8817.2008.00604.x
- Silva C. S. P., Genuário D. B., Vaz M. G. M. V., Fiore M. F. 2014. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. *Syst. Appl. Microbiol.* 37: 100–112.
- Strunecký O., Elster J., Komárek J. 2010. Phylogenetic relationships between geographically separate Phormidium cyanobacteria: is there a link between north and south polar regions? *Polar Biol.* 33: 1419–1428. doi: 10.1007/s00300-010-0834-8
- Taton A., Grubisic S., Ertz D., Hodgson D. A., Piccardi R., Biondi N., Tredici M. R., Mainini M., Losi D., Marinelli F., Wilmotte A. 2006. Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. *J. Phycol.* 42: 1257–1270. doi: 10.1111/j.1529-8817.2006.00278.x
- Yarushina M. I., Tanaeva G. V., Eremkina T. V. 2004. *Flora vodorosley vodoyemov Chelyabinskoy oblasti* [Algal Flora of waterbodies of the Chelyabinsk Region]. Ekaterinburg: 308 p. (In Russ.).
- Zhang R., Wu Q., Piceno Y. M., Desantis T. Z., Saunders F. M., Andersen G. L., Liu W. T. 2013. Diversity of bacterioplankton in contrasting Tibetan lakes revealed by high-density microarray and clone library analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86(2): 277–287. doi: 10.1111/1574-6941.12160

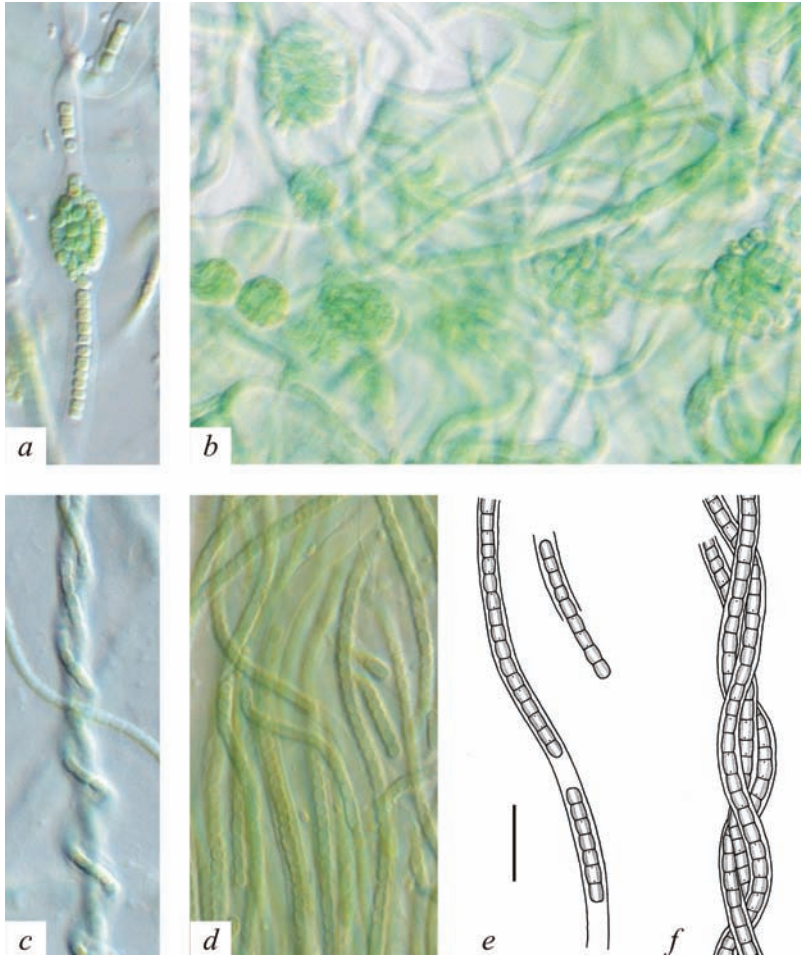


Таблица I. Рисунки и фотографии цианобактерии *Nodosilinea epilithica* ACSSI 34.

a — формирование узелка (двухнедельная культура); *b* — формирование узелков (трехмесячная культура); *c* — переплетение трихомов; *d* — трихомы; *e* — морфология и деление трихомов, образование гормогониев; *f* — парietальное расположение тилакоидов и наличие гранул у поперечных перегородок. Масштабная линейка: 10 мкм.

The pictures and photos of the cyanobacterium *Nodosilinea epilithica* ACSSI 34. *a* — nodule formation (2-week-old culture); *b* — nodule formation (3-month-old culture); *c* — trichome interlacement; *d* — trichomes; *e* — morphology and trichome division, hormogonia production; *f* — parietal thylakoid arrangement and appearance of granules at the cross walls. Scale bar: 10 μm .