

Санкт-Петербургский государственный университет

Полякова Елена Юрьевна

**Характеристика культивируемых цианобактерий –
представителей отдельных кластеров полифилетического
р. *Synechocystis***

Выпускная квалификационная работа
по направлению подготовки Биология
основная образовательная программа бакалавриата 020400 Биология

Работа выполнена на кафедре микробиологии Санкт-Петербургского
государственного университета (СПбГУ)

Научный руководитель: к.б.н., доцент С.Г. Аверина

Санкт-Петербург

2019

Список сокращений

ФЭ – фикоэритрин

ФЦ – фикоцианин

СА – хроматическая адаптация

ITS – внутренний транскрибируемый спейсер

ICBN – Международный Кодекс Ботанической Номенклатуры

ICNB/INCP – Международный Кодекс Номенклатуры Бактерий/Прокариот

Содержание

Введение	4
1. Обзор литературы	5
1.1 Общая характеристика цианобактерий	5
1.2 Систематика цианобактерий: история и современное состояние	7
1.3 Молекулярно-филогенетический и генотипический подходы в систематике цианобактерий	10
1.4 Характеристика р. <i>Synechocystis</i>	12
1.5 Характеристика р. <i>Geminocystis</i>	15
2. Материал и методы исследования	16
2.1 Список исследуемых штаммов	16
2.2 Условия и среды культивирования	17
2.3 Хроматическая адаптация	17
2.4 Оценка способности штаммов к росту при разной солености.	18
2.5 Получение биомассы клеток.	20
2.6 Выделение ДНК	20
2.6.1 СТАВ-метод выделения ДНК	20
2.6.2 STET-метод выделения ДНК	20
2.7 Полимеразная цепная реакция	21
2.7.1 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК	21
2.7.2 Амплификация участка внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рибосомного оперона	22
2.8 Электрофорез в агарозном геле	22
2.9 Очистка ПЦР-фрагментов	23
2.10 Секвенирование и филогенетический анализ последовательностей	23
2.11 Анализ последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомного оперона	23
3. Результаты и обсуждение	25
3.1 Характеристика морфологии и ультраструктуры исследуемых штаммов	25
3.2 Хроматическая адаптация исследуемых штаммов	28
3.3 Рост исследуемых штаммов при различном уровне солености среды	31
3.4 Молекулярно-филогенетический анализ исследуемых штаммов	34
3.5 Особенности организации участков внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рибосомного оперона	39
Выводы	46
Список литературы	47

Введение

Цианобактерии распространены повсеместно и являются важной частью экосистемы планеты. В силу характера метаболизма они выступают в роли первичных продуцентов, особенно в морских экосистемах, а также являются пионерами первичной сукцессии. Считается, что именно цианобактерии первыми приняли участие в создании кислородной атмосферы и являются предшественниками пластид водорослей и растений, что свидетельствует об их важной роли в эволюции живых организмов. Из-за огромного влияния цианобактерий на развитие биосферы Земли, их роли в современных экосистемах и возможности их использования в промышленности и биотехнологиях по всему миру проводятся активные исследования этой группы бактерий и создаются обширные коллекции штаммов.

Одной из таких коллекций является коллекция CALU СПбГУ, в составе которой насчитывается более 450 штаммов цианобактерий. В рамках ревизии коллекции было проведено исследование на выборке из 30 штаммов, отнесенных на основе морфологии к р. *Synechocystis*. Результатом молекулярно-филогенетического анализа короткого фрагмента гена 16S рРНК (600 п.н.) стало разделение исследуемых штаммов на 3 кластера: в состав Кластера 1, условно названного «*Synechocystis sensu stricto*», вошли истинные представители р. *Synechocystis* совместно с типовыми штаммами рода, а два других кластера локализовались дистантно (Карапетьян, 2017). Представители этих двух кластеров, обозначенных нами как Кластер «biofilms» (4 штамма) и Кластер «geminocystis» (5 штаммов), стали объектами нашего исследования.

Целью работы является полифазный анализ культивируемых штаммов цианобактерий – представителей двух кластеров полифилетичного р. *Synechocystis* и оценка возможности описания их в ранге новых таксонов уровня рода и/или вида.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи исследования:

1. Изучить морфологию и ультраструктуру исследуемых штаммов.
2. Изучить пигментный состав штаммов в зависимости от качества подаваемого света.
3. Изучить способность штаммов к росту при разной концентрации NaCl в среде.
4. Провести молекулярно-филогенетический анализ путем сравнения последовательностей гена 16S рРНК и 16S-23S рРНК внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS); провести анализ вторичной структуры последовательностей ITS.
5. Дать заключение о возможности/невозможности описания исследуемых штаммов в ранге новых таксонов уровня рода или вида.

1. Обзор литературы

1.1 Общая характеристика цианобактерий

Цианобактерии – граммотрицательные бактерии, входящие в состав фило *Cyanobacteria*. По типу питания большинство цианобактерий являются фотолитоавтотрофами: они используют свет в качестве источника энергии, неорганические вещества в качестве донора электронов и синтезируют органические соединения из неорганических источников углерода. Основным источником углерода для синтеза сахаров у цианобактерий является углекислый газ. Некоторые представители способны к факультативной фотолитогетеротрофии (Пиневиц, 2006).

Отличительная особенность фототрофии цианобактерий – использование в качестве донора электронов воды, при фотоокислении которой в качестве побочного продукта образуется кислород. Поэтому цианобактерий называют кислородными фототрофами. Редкие представители цианобактерий способны факультативно осуществлять анакисогенную фототрофию, при которой донором электронов становится сульфид-анион (Пиневиц, 2006).

Фотосинтетический аппарат цианобактерий имеет ряд особенностей. Цианобактерии являются единственными фототрофными прокариотами, которые имеют в составе фотосинтетического аппарата реакционные центры первого и второго типа одновременно (Пиневиц, Аверина, 2002). Функцию светособирающих комплексов у них выполняют фикобилисомы (ФБС) – эпимембранные частицы, локализующиеся на поверхности внутриклеточных фотосинтетических мембран. ФБС обычно имеют полудисковидную или полуэллипсоидную форму и содержат вспомогательные пигменты фотосинтетического аппарата – фикобилипротеины, а также неокрашенные линкерные полипептиды. Фикобилипротеины – это хромопротеины, состоящие из белка-носителя и ковалентно связанных с ним хромофорных групп – фикобилинов. Существует четыре вида фикобилинов, каждый из которых имеет свой максимум поглощения: фикоэритробилин (красный), фикоцианобилин (синий), фиковиолобилин (синий) и фикоуробилин (оранжевый). В зависимости от состава и соотношения хромофорных групп у цианобактерий выделяют 4 типа фикобилипротеинов: фикоэритрин (ФЭ), фикоцианин (ФЦ), аллофикоцианин (АФЦ) и фикоэритроцианин (ФЭЦ) (MacColl, 1998). Пигментный состав фикобилисом, их строение и положение может изменяться в зависимости от внешних условий.

Цианобактерии имеют три стратегии фотоакклиматизации – адаптации фотосинтетического аппарата к условиям освещения:

- изменение площади сечения антенны, которая обратно пропорциональна плотности светового потока,

- «кинетическая» стратегия с переходом состояний $1 \leftrightarrow 2$,

- хроматическая адаптация (chromatic adaptation, CA) или хроматическая акклиматизация (Пиневич, Аверина, 2002).

Последняя стратегия является уникальной и наиболее распространенной стратегией, при которой изменяется пигментный состав светособирающих комплексов фотосинтетического аппарата в зависимости от качества подаваемого света. Tandeau de Marsac первым выделил типы хроматической адаптации, распределив штаммы, содержащие ФЭ и ФЦ, на три группы в зависимости от их ответа на освещение зеленым или красным светом:

- первый тип хроматической адаптации (CAI), при котором содержание ФЭ и ФЦ постоянно и не изменяется при смене условий освещения;

- второй тип хроматической адаптации (CAII), когда в клетках регулируется только количество ФЭ;

- третий тип хроматической адаптации (CAIII), характеризующийся изменениями в содержании ФЭ, и ФЦ (Tandeau de Marsac, 1977).

Четвертый тип хроматической адаптации (CAIV), описанный у морских штаммов р. *Synechococcus*, характеризуется изменением спектроскопических свойств ФЭ в ответ на освещение синим или зеленым светом и связан с изменениями в содержании и соотношении хромофорных групп фикоэритробилина/фикоуробилина этого фикобилипротеина (Everroad et al., 2006).

Хроматическая адаптация пятого типа (CAV) обнаружена впервые у *Acaryochloris marina* MBIC11017, который содержит в составе фотосинтетического аппарата длинноволновую форму хлорофилла – хлорофилл d и имеет необычные мини-ФБС в форме стержней (цилиндров). CAV характеризуется изменением содержания ФЦ в ответ на красно-оранжевый свет (Duxbury et al., 2009).

Хроматическая адаптация шестого типа (CAVI) или фотоакклиматизация к дальнему красному свету обнаружена у цианобактерий, живущих в микробных матах, где количество дальнего красного света выше по сравнению с видимым светом (Gan et al., 2014). В этом случае цианобактерии адаптивно синтезируют длинноволновую форму хлорофилла – хлорофилл f, а также меняют пигментный состав и морфологию ФБС.

Недавно был описан новый вариант хроматической адаптации (CAVII) у цианобактерий, не содержащих ФЭ, но способных синтезировать ФЭЦ. В данном случае

наблюдаются изменения в строении ФБС и содержании в ней ФЭЦ при освещении зеленым или красным светом (Hirose et al., 2019).

Несмотря на то, что в отношении метаболизма цианобактерии достаточно однообразны, они характеризуются широким морфологическим разнообразием и представлены одноклеточными и нитчатыми (трихомными) формами; могут иметь сферическую, эллипсоидную или палочковидную форму; существовать поодиночке или в агрегатах. Трихомы могут быть прямыми или закрученными в спираль; с ложным или истинным ветвлением; образовывать дифференцированные клетки, такие как акинеты или гетероцисты (Пиневич, 2006).

Цианобактерии могут расти и развиваться практически во всех неэкстремальных экологических нишах, ограничениями выступают недостаток воды и низкие значения pH (4-5). В водных экосистемах, как в морских, так и в пресных, цианобактерии образуют придонные маты, являются нейстоном или пикопланктоном. Наземные представители образуют биопленки на твердых субстратах. Цианобактерии вступают в симбиотические взаимоотношения с другими бактериями, растениями, протистами (Пиневич и др., 2010). Очень немногие способны расти при низкой активности воды, например, в аридных зонах. В основном, свободноживущие цианобактерии являются мезофилами, но встречаются и термофильные формы, живущие в водоемах с температурой 75°C, и психрофилы, обитающие на скалах, в почве или водоемах субполярных и полярных областей (Пиневич и др., 2010).

1.2 Систематика цианобактерий: история и современное состояние

Цианобактерии, как биологические объекты, были описаны учеными-ботаниками ещё в XIX веке, например, р. *Chroococcus* (Nägeli, 1849), р. *Gloeocapsa* (Kützing, 1843), р. *Synechococcus* (Nägeli, 1849). Изначально их рассматривали как отдельную группу водорослей – «*Cyanophyceae*» или «сине-зеленые водоросли», так как они были сходны с водорослями образом жизни, морфологией, окраской клеточных скоплений (Sachs, 1874). В 1875 году Ferdinand Julius Cohn выделил бактерий в отдельный таксон «*Schizophyta*» или «грибы-дробянки» из-за их способа размножения и отсутствия оформленного ядра. Цианобактерии вошли в этот таксон как класс «*Schizophyceae*» (Cohn, 1875).

До середины XX века цианобактерии были беспорным объектом альгологии. Активно развивалась альгологическая систематика, описывались новые таксоны, создавались определители, в частности, «Определитель пресноводных водорослей СССР: выпуск 2, Синезеленые водоросли» (Голлербах и др., 1953). Микробиологические подходы

не применялись: не было питательных сред, не создавались коллекции культур, таксоны создавались на основе морфологического описания природного материала.

В 1962 году, проанализировав все полученные ранее сведения об особенностях организации бактериальной клетки, Stanier и van Niel выделили бактерии как отдельную группу живых существ – прокариоты (Stanier, van Niel, 1962). Тут же были приведены явные доказательства принадлежности сине-зеленых водорослей к прокариотам. Позднее был введен и сам термин «цианобактерии», который дал название филе (Stanier, 1977). С этого момента к цианобактериям начинают активно применяться, в основном Stanier и его командой, микробиологические методы: разрабатываются питательные среды и подходы культивирования, выделяются штаммы, создаются коллекции культур, новые таксоны называются согласно правилам Международного Кодекса Номенклатуры Бактерий (ICNB) (Rippka et al., 1979; Rippka et al., 1981; Waterbury, Stanier, 1981; Rippka, 1988).

Исходя из неопровержимых доказательств о принадлежности цианобактерий к прокариотам, Stanier предложил руководствоваться при составлении их систематики правилами ICNB (Stanier et al., 1978). Ранее это было невозможно из-за выполнения таксономического анализа на основе определения признаков природного материала и отсутствия лабораторных культур. Теперь, в виду применения микробиологических подходов и растущего количества штаммов цианобактерий в коллекциях культур, это было логичное решение. Ещё одним аргументом стало то, что Международный Кодекс Ботанической Номенклатуры (ICBN) не признает культуру как номенклатурную единицу и, в основном, использует гербарные образцы, описания и иллюстрации, в то время как в ICNB типовая культура/штамм является основой. 1 января 1979 года номенклатура цианобактерий должна была окончательно перейти в ведение ICNB.

Однако этого не произошло, и в систематике цианобактерий закрепились 2 подхода: ботанический и бактериологический. Развитием бактериологического подхода стало включение цианобактерий, как отдельной группы, в состав многотомного «Руководства по систематике бактерий Берги», первая редакция которого выходила с 1984 по 1989. Вторая, переработанная и улучшенная, редакция выходила с 2001 по 2012, а в 2015 была переведена в онлайн-форму. В ней для классификации прокариотов уже активно использовался молекулярно-филогенетический подход, согласно которому цианобактерии были выделены в отдельную филу (Castenholz, 2001). Но из-за недостатка молекулярных данных, внутренняя система филы была построена на морфологическом, физиологическом, экологическом и ультраструктурном критериях. На базе уже существовавших ботанических порядков образованы 5 субсекций, а вместо таксона «род» создан новый искусственный таксон «форма-род». В результате использования вышеперечисленных критериев, в особенности

морфологического, многие форм-роды являются полифилитичными таксонами, что признают и сами авторы руководства (Castenholz, 2001).

Среди сторонников альгологического подхода к систематике цианобактерий можно выделить таких исследователей, как Jiri Komarek и Konstatinos Anagnostidis. Ими были описаны и переописаны множество таксонов, созданы подробные определители (например, Komarek, Anagnostidis, 1998; Komarek, Anagnostidis, 2005). В 2014 году группой альгологов под руководством Jiri Komarek была представлена новая, переработанная система цианобактерий/цианопрокариот (Komarek et al., 2014). Согласно предложенной системе, выделение восьми таксонов в ранге порядков осуществлялось на основе молекулярно-филогенетических признаков. В частности, анализировались не только последовательности гена 16S рРНК, но и последовательности генов, кодирующих 31 консервативный белок у цианобактерий. Таксоны более низкого ранга выделялись на основе полифазного подхода, включающего комплекс признаков (морфологические, экологические, молекулярные и т.д.). Однако из-за недостатка имеющихся молекулярных данных, многие семейства или роды всё ещё основываются только на морфологических, ультраструктурных, экологических и физиологических признаках. Кроме этого, в систему включены таксоны, которые известны только по ботаническим описаниям. В 2019 году на основе этой системы была представлена онлайн база данных родов цианобактерий (Komarek and Hauer, 2019: <http://www.cyanodb.cz>).

На данный момент сложилась парадоксальная ситуация: одну и ту же группу описывают 2 разные системы. Полный перенос номенклатуры цианобактерий в введение ICNB/ICNP (Международный Кодекс Номенклатуры Прокариот) оказывается невозможным: правила кодекса запрещают использование названий, которые уже использовались в других системах. Было предложено полностью вывести цианобактерий из ведения ICNP и описывать их, руководствуясь ICBN, путем изменения Общего Положения 5 ICNP на следующее: «"Прокариоты" включают те организмы, которые известны как *Schizomycetes*, *Bacteria*, *Eubacteria*, *Archaeobacteria*, *Archaeobacteria* и *Archaea*. Данный кодекс не охватывает номенклатуру *Cyanobacteria*/*Cyanophyceae*/*Cyanophyta*, которая традиционно охватывается Международным Кодексом Номенклатуры водорослей, грибов и растений. Однако, названия родов и видов цианобактерий, которые были опубликованы в соответствии с правилами ICNP, сохраняются в номенклатуре» (Oren и Garrity, 2014).

В ответ на это предложение было высказано несколько критических замечаний, в том числе и то, что цианобактерии, в таком случае, будут описаны по правилам, предназначенным для совершенно иной филогенетической группы, и предложено изменить Принцип 2 ICNP на следующий: «Номенклатура прокариот не является независимой от зоологической номенклатуры, так же как от номенклатуры водорослей, грибов и растений.

Единственное исключение относится к названиям кислородных фотосинтезирующих бактерий (цианобактерий), которые легитимно опубликованы как названия водорослей в соответствии с Международным Кодексом Ботанической номенклатуры/Международным Кодексом номенклатуры водорослей, грибов и растений» (Pinevich, 2015). На сегодняшний день консенсус в подходах к систематике цианобактерий по-прежнему не достигнут.

1.3 Молекулярно-филогенетический и генотипический подходы в систематике цианобактерий

В конце XX века накопленные знания и техническая база позволили использовать молекулярные и генетические критерии в систематике живых объектов. Одними из самых первых подходов к оценке степени родства прокариот стали: установление и сравнение процентного содержания пар G-C в геномах, определение и сравнение общих размеров геномов и определение уровня ДНК-ДНК гибридизации. Хорошим примером может послужить «Руководство по систематике бактерий Берги», где эти методы используются повсеместно для установления филогенетического родства между различными таксонами бактерий (Castenholz, 2001; Schleifer, 2009).

Результатом поиска оптимального молекулярного критерия сравнения различных таксонов стало предложение использовать ген 16S рРНК для бактерий (Guttel et al., 1994). Ген 16S рРНК достаточно консервативен, так как является геном матричных процессов, и отлично подходит для разграничения таксонов уровня вида и выше. Исследования оптимального процента гомологии для разграничения таксонов уровня вида идут до сих пор. По последним данным, граница проходит на 98,2-99,0% сходства (Kim et al., 2014). Но, в большинстве случаев, для разграничения видов используется комплексный подход, включающий не только молекулярные, но и морфологические, физиологические, экологические признаки. В пример можно привести критерии, предложенные Jeffrey R. Johansen и Dale A. Casamatta (Johansen, Casamatta, 2005). В целом, использование гена 16S рРНК для молекулярно-филогенетического анализа стало общепризнанным и обязательным критерием в систематике прокариот, который активно используется и на сегодняшний день (Margheri et al., 1999; Fiore et al., 2007; Callieri et al., 2013; Mareš et al., 2019).

Всё чаще в последние десятилетия для разграничения таксонов вместе с геном 16S рРНК стали использовать последовательности генов, кодирующих различные белки, участвующие в матричных процессах и метаболизме. Например, у diazotrophic цианобактерий анализируют гены оперона нитрогеназного комплекса (*nif*-гены) (Singh et al., 2015). Для цианобактерий, синтезирующих токсин микроцистин, рассматривают последовательности генов *mcu*-кластера (Gtowacka et al., 2011). Также анализу могут

подвергнуться гены субъединиц РНК-полимеразы: *rpoC1* (Mares et al., 2019) и *rpoB*; последовательности генов компонентов фотосинтетического аппарата: оперона фикоцианина (*pscBA-IGS*) (Choi et al., 2012) и фикоэритрина (*speA*) (Hirose et al., 2019); гены большой и малой субъединиц одного из главных ферментов цикла Кальвина – Рубиско (Mares et al., 2019). Эти последовательности применяются при разграничении таксонов ранга рода и выше совместно с геном 16S рРНК.

Для анализа на внутривидовом уровне часто стала анализироваться последовательность внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), локализованного между генами 16S и 23S рРНК рибосомного оперона. Сравниваются общая длина ITS, анализируются последовательности и вторичная структура доменов, выделенных Isabelle Iteman и др.: D1-D1', V2, B-box, V3 и других (Iteman et al., 2000; Mares et al., 2019; Johansen et al., 2011). Эти домены, кроме вариабельных доменов V2 и V3, содержат в себе короткие консервативные участки, которые являются уникальными для таксонов высокого порядка. Из-за частичного спаривания комплементарных оснований внутри доменов образуются петли, которые могут быть фланкированы консервативной последовательностью (рис. 1).

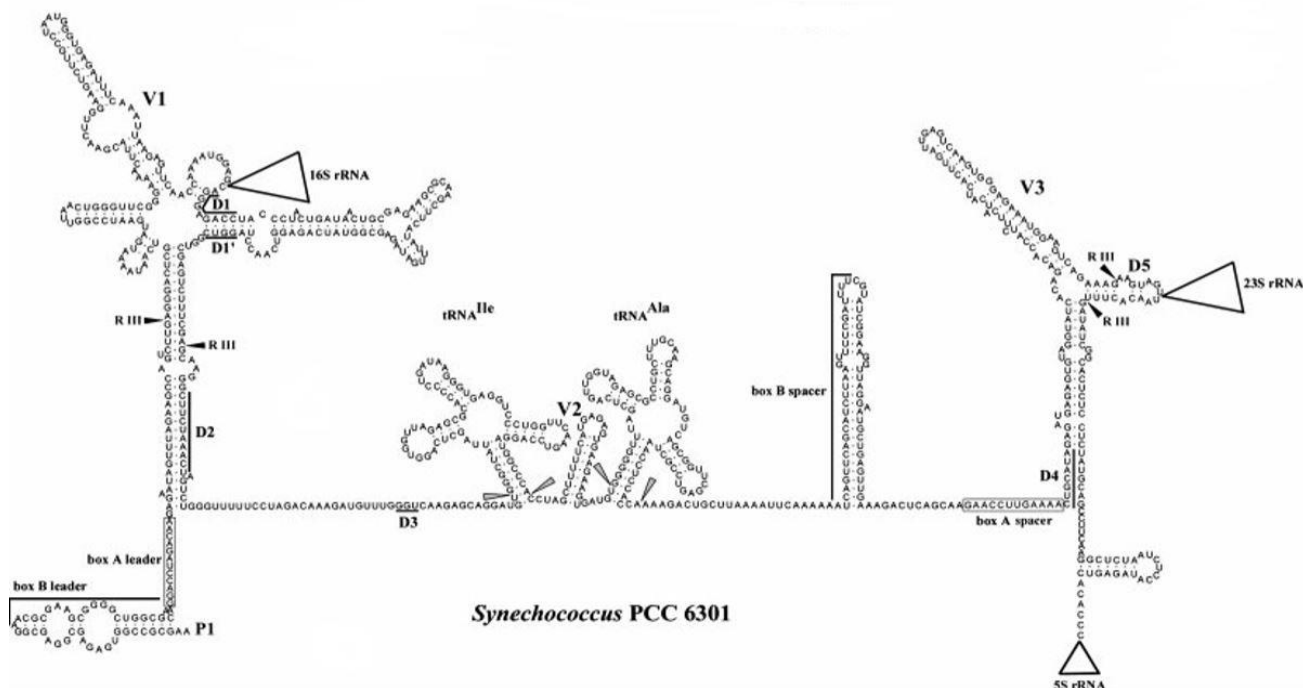


Рисунок 1. Структура 16S–23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) *Synechococcus* sp. PCC 6301 (no: Iteman et al., 2000).

Внутри последовательности ITS также могут обнаруживаться последовательности, кодирующие тРНК. Это могут быть тРНК глутаминовой кислоты, аланина и изолейцина (Boyer et al., 2001). Два самых распространённых варианта: либо отсутствие тРНК, либо

наличие двух тРНК (аланина и изолейцина), третий вариант – наличие одной из трех тРНК (Boyer et al., 2001).

Стоит отметить, что геном цианобактерий может содержать несколько рибосомных оперонов, нуклеотидная последовательность которых может различаться в пределах одного организма. Было выяснено, что также может быть несколько вариантов последовательностей 16S-23S ITS, находящихся в разных рибосомных оперонах (Boyer et al., 2001). Вариабельность последовательностей 16S-23S ITS позволяет использовать их при разграничении таксонов на уровне рода и вида.

Последней тенденцией стало одновременное использование большого количества последовательностей различных белок-кодирующих генов и гена 16S рРНК для построения наиболее достоверной филогении (Komarek et al., 2014; Parks et al., 2018).

1.4 Характеристика р. *Synechocystis*

Впервые род *Synechocystis* был описан как отдельный таксон в 1892 году французским ботаником Камилем Соважо. Впоследствии, австрийский ботаник и цитолог Лотар Гейтлер представил более подробное морфологическое описание представителей этого рода в разработанной им альгологической системе (Geitler, 1932).

Род четко выделялся на основе морфологических признаков и был представлен одиночными шаровидными клетками без чехла или капсулы, встречающимися в различных местообитаниях. Размножение осуществляется бинарным делением со сменой двух последовательных перпендикулярных плоскостей. Впоследствии характеристика рода была дополнена ультраструктурными данными о периферической локализации тилакоидов в клетках, присутствии гексагонального S-слоя и образовании перетяжки (анг. pinching) при делении. Типовым видом рода является *S. aquatilis*. В составе альгологического рода описано 25 видов, отличающихся по размерам клеток и экологии (Komarek and Anagnostidis 1998, Komarek and Hauer 2019: <http://www.cyanodb.cz>).

В то же время, этот таксон был официально включен в «Руководство Берги по систематике бактерий» (2001) в качестве форм-рода *Synechocystis*, относящегося к Субсекции I (бывший пор. *Chroococcales*). Его представители – это одноклеточные цианобактерии, имеющие сферические клетки диаметром 2-6 мкм. Они размножаются бинарным делением с последовательной сменой двух или трех плоскостей. Чаще всего клетки располагаются по отдельности или парами, реже формируют скопления, скрепленные слизью. Четко выраженных чехлов или капсул нет. Следует отметить, что характеристика рода была составлена на основе анализа признаков культивируемых штаммов, представленных в

коллекции культур цианобактерий института Пастера (Pasteur Culture collection of Cyanobacteria (PCC), <https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/>).

Ф-р. *Synechocystis* был разделен на 3 кластера, отличающихся размерами клеток, физиологическими свойствами и особенностями ДНК.

Кластер 1 включает представителей с «низким процентом G+C» (34,7-37%), диаметром клеток 4-6 мкм, имеющих 2 плоскости деления, с низкой устойчивостью к соли, облигатным фотоавтотрофным типом питания и низким содержанием полиненасыщенных жирных кислот. В природе представители этого кластера могут образовывать прямоугольные колонии, похожие на колонии р. *Merismopedia*. Обитают в пресных водоемах, являются мезофилами. Часть штаммов (PCC 6711, PCC 6804) вырабатывают аморфный материал капсулы. Некоторые штаммы (PCC 6701, PCC 6711, и PCC 6808) имеют хроматическую адаптацию II типа и могут синтезировать С-фикоэритрин. Три штамма, а именно PCC 6711, PCC 6804, и PCC 6808, обладают скользящей подвижностью. Типовым штаммом считается PCC 6308. В целом, представители Кластера 1 разнообразны по физиологическим и морфологическим свойствам, но объединяются на основе молекулярно-филогенетического критерия.

Кластеры 2 и 3 характеризуются «высоким процентом G+C» (46-48% и 42.1-44.9% соответственно). Кластер 2 включает клетки с диаметром 2-4 мкм, с двумя плоскостями деления и отсутствием синтеза фикоэритрина. В нём, также, выделяют 2 субкластера. Субкластер 2.1 включает в себя 13 штаммов из разнообразных местообитаний (наземные, пресноводные, солоноватые и соленые). Размер клеток примерно одинаков (2.3-2.6 мкм в диаметре), но есть разница в процентном соотношении G+C пар (46.1-48 %) и размере генома (1.8-2.4 кДа). Все представители эвригалинные и могут переходить к фотогетеротрофии, в основном используя глюкозу в качестве источника углерода. Один штамм (PCC 6906) использует глицерол вместо глюкозы. У некоторых штаммов наблюдается высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот, что отличает их от кластера 1. Типовой штамм – PCC 6803. Субкластер 2.2 включает только 2 штамма: PCC 8938 и 8974. Процентное соотношение G+C пар (47.5 и 46.6 %) и размер генома (2.2 и 2.0 КДа) не сильно отличаются. Также как и представители субкластера 2.1, являются эвригалинными, но размеры клеток больше (3-4 мкм в диаметре) и все представители – облигатные фотоавтотрофы. Кроме этого, штаммы субкластера 2.2 имеют низкую степень гибридизации ДНК-ДНК со штаммами субкластера 2.1. Типовой штамм – PCC 8938.

Кластер 3 занимает промежуточное положение между кластерами 1 и 2 по молярному проценту G+C пар (42.1-44.9%). Все представители не содержат С-фикоэритрина. Два штамма, PCC 6902 и PCC 7008, выделены из солоноватой и пресноводной среды обитания

соответственно, являются эвригалинными и облигатными фотоавтотрофами, но различаются по молярному проценту G+C пар (42.1% и 44.9%). Два других штамма, PCC 7509 и PCC 7511, обнаружены в известняковых породах в разных участках швейцарских Альп. Они похожи по размеру клеток (3-3.5 мкм в диаметре), проценту G+C пар (42.5 и 43.2% соответственно) и размеру генома (3.5 и 3.3 КДа); оба имеют низкую солеустойчивость и факультативную фотогетеротрофию. Причем это единственные штаммы ф-р. *Synechocystis* способные использовать сахарозу помимо глюкозы. Также к кластеру 3 относят штамм PCC 7921 на основе анализа внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомного оперона.

Представители ф-р. *Synechocystis* оказались очень разнообразны как по местообитаниям, так и по физиологическим, генетическим и метаболическим признакам. Разброс в процентном соотношении G+C пар и данные молекулярно-филогенетического анализа (включающего 16S-23S ITS регионы), а также данные морфометрии и ультраструктурные особенности, позволяли говорить о полифилетичности форм-рода *Synechocystis* и возможности обособления новых таксонов (Castenholz, 2001). В то время это не было сделано из-за недостаточного количества данных.

Бактериологический форм-род *Synechocystis* претерпел некоторые изменения в сравнении с ботаническим родом. Так, из него был выделен «микроцистиновый кластер» в отдельный род *Microcystis*. Два штамма (WH 8501 и WH 8502), ранее характеризующиеся как «морской кластер», стали дополнением к виду рода *Cyanothece*. В него стали входить некоторые ботанические рода и виды, ранее выделявшиеся как отдельные таксоны. Например, р. *Merismopedia*, отличающийся от р. *Synechocystis* только способностью образования характерных клеточных агрегатов. Многие штаммы, ранее идентифицированы как р. *Aphanocapsa*, также включены в форм-род *Synechocystis*.

В 2009 году, проанализировав все перечисленные выше признаки, J. Korelusova с коллегами выделили представителей кластера 1 в отдельный род *Geminocystis* (Korelusova et al., 2009). Данный таксон был описан по правилам Международного кодекса ботанической номенклатуры (ICBN), поэтому официально не признается в рамках бактериологической системы. Характеристика этого альгологического рода представлена в следующей главе.

В новой альгологической системе р. *Synechocystis* отнесен к сем. *Merismopediaceae* в составе пор. *Synechococcales* (Komarek et al., 2014). Р. *Geminocystis* был включен в представленную систему, однако он рассматривался в составе сем. *Chroococcaceae* пор. *Chroococcales*.

1.5 Характеристика р. *Geminocystis*

Новый р. *Geminocystis* был выделен из состава ф.-р. *Synechocystis* в результате анализа ряда штаммов с использованием современных молекулярно-филогенетических и ультраструктурных методов. В него вошли штаммы, отнесенные ранее к кластеру 1 ф.-р. *Synechocystis* (Korelusova et al., 2009).

Штаммы нового рода отличались низким молярным процентом G+C пар (34.7% для штамма PCC 6308) по сравнению со штаммом *Synechocystis* PCC 6803 (47.5%) из кластера 2.

Наблюдались различия в архитектуре тилакоидов в клетках исследуемых штаммов. У штамма *Synechocystis* PCC 6803 (кластер 2) тилакоиды локализуются на периферии клетки концентрическими кругами, что соответствует диагнозу альгологического р. *Synechocystis* (Koma'rek and Anagnostidis 1998). У представителей р. *Geminocystis* тилакоиды расположены параллельно продольной оси клетки, занимая практически весь объем цитоплазмы.

У представителей двух родов наблюдались значительные различия в структуре маркерных участков рибосомного оперона - внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS), расположенных между последовательностями генов 16S и 23S рРНК. В частности, регионы D1-D1', V3 и box B представителей р. *Geminocystis* оказались короче аналогичных регионов представителей р. *Synechocystis* (Korelusova et al., 2009; Itehan et al., 2000). Более того, ITS р. *Geminocystis* содержит тРНК для аминокислот аланина и изолейцина, опероны рРНК р. *Synechocystis* имеют в составе только тРНК изолейцина.

Типовой видом нового рода стал штамм из коллекции института Пастера PCC 6308 (<https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/>), который был назван *Geminocystis herdmanii*.

2. Материал и методы исследования

2.1 Список исследуемых штаммов

В работе использовались штаммы из коллекции CALU (ресурсный центр «Культивирование микроорганизмов» Научного парка Санкт-Петербургского государственного университета; <http://researchpark.spbu.ru/collection-ccem-rus/1628-ccem-kolleksiya-calu-rus>). Штаммы ранее были идентифицированы на основе фенотипических признаков как представители форм-рода *Synechocystis*.

1. ***Synechocystis* sp. CALU 1077,**

Выделен из пресной воды прибрежной зоны Финского залива, Лисий Нос, Россия (1996г.)

2. ***Synechocystis* sp. CALU 1127,**

Выделен из воды озера Ладожское, Ленинградская обл., Россия (1999г.).

3. ***Synechocystis* sp. CALU 1173,**

Выделен из воды озера Ладожское, Ленинградская обл., Россия (2000г.).

4. ***Synechocystis* sp. CALU 1174,**

Выделен из воды озера Ладожское, Ленинградская обл., Россия (2000г.).

5. ***Synechocystis* sp. CALU 1334,**

Выделен из воды озера Ладожское, Ленинградская обл., Россия (1999г.).

6. ***Synechocystis* sp., CALU 1759,**

Выделен из озера Короцкое, Валдайский район, Новгородская область, Россия (2014г.).

7. ***Synechocystis* sp. CALU 1794,**

Выделен из озера Короцкое, Валдайский район, Новгородская область, Россия (2014г.).

8. ***Synechocystis* sp., CALU 1801,**

Выделен из озера Короцкое, Валдайский район, Новгородская область, Россия (2014г.).

9. ***Synechocystis* sp., CALU 1807,**

Выделен из озера Короцкое, Валдайский район, Новгородская область, Россия (2014г.).

Микрофотографии исследуемых штаммов сделаны с помощью камеры Leica DFC500 на микроскопе Leica DM2500 с увеличением $\times 1000$.

2.2 Условия и среды культивирования

Объекты исследования культивировались на среде №6 (Громов, 1983) и на среде BG11 (Rippka, 1988). Использовались как жидкие среды, так и среды с добавлением 0,8-1,2% агара.

Состав среды №6 (на 1 литр): KNO_3 – 1г; K_2HPO_4 – 0,2г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2г; CaCl_2 – 0,15г; NaHCO_3 – 0,16г; раствор микроэлементов – 1мл.

Состав концентрированного раствора микроэлементов: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,022г; MnSO_4 – 1,81г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,079г; $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 2,63г; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 9,3г; CaCl_2 – 1,2г; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,02г; Na_2EDTA – 10г.

Состав среды BG11 (на 1 литр): NaNO_3 – 0,3г; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,04г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,075г; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,036г; FeNH_4 цитрат – 0,006г; Na_2EDTA – 0,001г; Na_2CO_3 – 0,02г; раствор микроэлементов – 1мл.

Состав концентрированного раствора микроэлементов (на 1 литр): H_3BO_3 – 2,86г; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22г; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,39г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08г; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,05г.

Культивирование осуществлялось при постоянном освещении лампами белого света с интенсивностью 500 Лк и комнатной температуре (22-24 °С) в течение 7-14 суток.

2.3 Хроматическая адаптация

Исследуемые штаммы были проверены на способность к изменению пигментного состава в зависимости от качества освещения. Для этого культуры выращивали в чашках Петри на жидкой среде под зеленым и красным светофильтрами (108/124 и Lee 106 (Andover, England, рис. 2) в течение 12 суток при комнатной температуре (22-24°С). Освещение было постоянным с интенсивностью в 500 Лк.

Для исследования наличия фикобилипротеинов в культурах штаммов при разном качестве освещения, клетки отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 6000 об./мин в течение 5 минут. Затем осадок клеток промывали 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 8) и центрифугировали при тех же условиях. Супернатант сливали, а осадки ресуспендировали в 5 мл 50 мМ Na-фосфатного (рН 8) буфера. Клетки разрушали с помощью ультразвука на установке Techpan UD-20. Далее, полученные препараты освобождали от крупных клеточных частиц, центрифугируя их при 6000 об./мин 5 минут. Центрифугат помещали в пробирки Eppendorf и центрифугировали при 14000 об./мин 10 минут. Для удаления мелких мембранных фрагментов центрифугат пропускали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore).

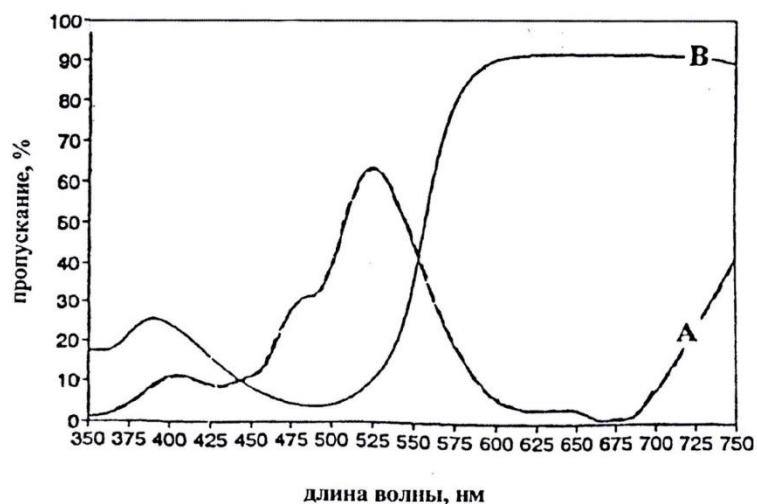


Рисунок 2. Спектры пропускания зеленого (А) и красного (В) светофильтров.

Полученные бесклеточные препараты анализировались при помощи спектрофотометра 2802S UV/VIS (Unico) в диапазоне 300-800 нм. Контролем служил 50 мМ Na-фосфатный буфер (рН 8).

2.4 Оценка способности штаммов к росту при разной солености

С этой целью штаммы культивировали на среде №6 или на среде BG11, разбавленных в 2 раза, при пяти вариантах концентрации соли в среде (контроль, 0,3%, 1%, 2% и 3,5% NaCl) в течение 10 суток. Изменение содержания биомассы фиксировали методом измерения оптической плотности культур.

При посеве в стерильную пробирку вносили 7 мл стерильного солевого раствора (с концентрациями 0,6%, 2%, 4% и 7%) или стерильной дистиллированной воды (контроль), после добавляли 7 мл инокулята и тщательно перемешивали. Инокулятом служили семидневные суспензии, выращенные в колбах на 100 мл.

Культивирование проводили в пробирках на 30 мл, содержащих 14 мл суспензии, при постоянном освещении белым светом интенсивностью 500 Лк и комнатной температуре, в 2 двух параллелях. Для каждого штамма было проведено как минимум 3 независимых эксперимента.

Измерение оптической плотности проводили сразу после посева, а затем на 3, 7 и 10 сутки культивирования при длине волны 750 нм с помощью спектрофотометра 2802S UV/VIS (Unico). Контролем служила питательная среда, смешанная с равными объемами солевых растворов или дистиллированной воды. Данные двух параллелей опыта усреднялись и использовались для построения графиков накопления биомассы.

Статистическая обработка данных проводилась путем сравнения графиков накопления биомассы при разных концентрациях NaCl в ходе анализа остаточных дисперсий относительно моделей роста (Максимович, 1989). В качестве модели роста использовали уравнение прямой линии.

Используемый метод состоял в сопоставлении величин остаточной дисперсии, получаемых при

- описании каждого из двух сравниваемых графиков накопления биомассы собственным уравнением

$$S_1^2 = (SS_1 + SS_2) / (n_1 - 3 + n_2 - 3);$$

где S_1^2 – остаточная дисперсия; SS_1 и SS_2 – девиаты сравниваемых графиков; n_1 и n_2 – выборки сравниваемых графиков.

- проведении аналогичных расчетов по общему уравнению

$$S_2^2 = SS / (n_1 + n_2 - 3);$$

где S_2^2 – остаточная дисперсия общего уравнения; SS – девиата общего уравнения; n_1 и n_2 – выборки сравниваемых графиков.

Значимость различий между дисперсиями определяли по критерию Фишера

$$F = S_2^2 / S_1^2 > F_{кр};$$

где F – полученное значение критерия Фишера; $F_{кр}$ – табличное значение критерия Фишера; S_1^2 – остаточная дисперсия собственного уравнения; S_2^2 – остаточная дисперсия общего уравнения.

В качестве меры расстояния между сравниваемыми графиками накопления биомассы брали частное от деления *F-критерия* на его критическое значение ($F_{кр}$). Результаты сравнения каждой пары рядов представляются в виде матрицы, исследование которой осуществлялось с использованием кластерного анализа. В матрице значения $F/F_{кр} < 1$ свидетельствовали о том, что на выбранном уровне значимости (в данной работе - $\alpha < 0,05$) различия между рядами случайны. Объединение элементов матрицы осуществлялось на основе взвешенного парногруппового метода с определением в каждом конкретном случае параметров общего уравнения, суммы квадратов отклонений всех входящих в данный кластер рядов от общей теоретической линии и остаточной дисперсии. Результаты кластерного анализа для наглядности представлены в виде дендрограмм. Расчеты проведены с использованием оригинальных программ, составленных Н.В. Максимовичем и Т.С. Ивановой.

2.5 Получение биомассы клеток

Для выделения тотальной ДНК использовали биомассу культур, находящихся в стадии активного роста (7 - 14 суток культивирования в жидкой питательной среде). Культуры центрифугировали при 5000 об/мин в течение 4 мин в центрифуге Eppendorf Centrifuge 5415C. Полученный осадок промывали стерильным ТЕ буфером (10 мМ TrisHCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8) и центрифугировали при тех же условиях. Процедуру промывки повторяли 3 раза. Полученные осадки хранили при температуре -20°C.

2.6 Выделение ДНК

Тотальную ДНК выделяли с помощью метода СТАВ (Murray, Thompson, 1980) и модифицированного метода с использованием STET буфера (автор методики — В.В. Зинченко, кафедра генетики, МГУ, http://molbiol.ru/protocol/24_01.html#a2).

2.6.1 СТАВ-метод выделения ДНК

Полученный ранее осадок клеток ресуспендировали в 500 мкл лизирующего СТАВ буфера (2%-ный цетилтриметиламмоний бромид, 0,1 М TrisHCl, 20 мМ ЭДТА, 1,5 М NaCl, 0,2% β-меркаптоэтанол, 2 мкг/мг протеиназы К; pH 8) и инкубировали при 65°C в течение 3,5–4 час, при периодическом перемешивании на вортексе. К получившемуся лизату добавляли равный объем холодной смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и инкубировали при -20°C в течение 30 мин, периодически перемешивая. После смесь центрифугировали при 13000 об./мин в течение 15 мин. Отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, в новые микроцентрифужные пробирки и добавляли изопропанол в соотношении 2/3 от объема водной фазы. Тщательно перемешивали и инкубировали при -20°C в течение ночи. Затем пробы центрифугировали при 10000 об./мин в течение 15 мин при 4°C. Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК сушили и дважды промывали в 500 мкл холодного 86%-ного этанола, центрифугируя при тех же условиях. Отмытый осадок высушивали и растворяли в 20 мкл стерильной дистиллированной воды для инъекций. К пробам добавляли 2 мкл раствора РНК-азы (10 мг/мл в 10 мМ TrisHCl, 15 мМ NaCl; pH 7,5) и инкубировали в течение часа при 37°C.

2.6.2 STET-метод выделения ДНК

Полученный ранее осадок клеток ресуспендировали в 270 мкл STET буфера (8% сахара, 5% тритон X-100, 50мМ EDTA-Na₂, pH=8.0, 50мМ Tris-HCl, pH=8.0), добавляли 15 мкл хлороформа и перемешивали на вортексе 3 минуты. После добавляли 30 мкл лизоцима (концентрация 50 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 35 минут. Далее

добавляли 100 мкл 10% SDS и инкубировали при 65°C в течение часа, после добавляли 100 мкл 5M NaCl и инкубировали при 65°C в течение 35 минут. С помощью 1M NaCl доводили объем полученного лизата до 500 мкл. После этого добавляли 500 мкл холодной смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1), инкубировали при -20°C в течение 20 минут, периодически перемешивая. Пробы центрифугировали при 14000 об./мин в течение 10 минут и отбирали верхнюю водную фазу, содержащую ДНК, в новую микроцентрифужную пробирку. Отобранную водную фазу ещё раз обрабатывали равным объемом смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и центрифугировали при тех же условиях. К полученной водной фазе добавляли изопропанол в соотношении 2/3 от объема водной фазы, перемешивали и инкубировали при -20°C в течение ночи. Затем пробы центрифугировали при 14000 об./мин в течение 15 мин при 4°C. Полученный осадок ДНК сушили и дважды промывали в 500 мкл холодного 86%-ного этанола, центрифугируя при тех же условиях. Отмытый осадок высушивали и растворяли в 20 мкл стерильной дистиллированной воды. К пробам добавляли 2 мкл раствора РНК-азы (10 мг/мл в 10 mM TrisHCl, 15 mM NaCl; pH 7,5) и инкубировали в течение часа при 37°C.

Для оценки качества и примерного количества выделенной ДНК использовали метод электрофореза в агарозном геле.

2.7 Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию проводили на приборе MJ MiniGradient Thermal Cycler (BioRad).

2.7.1 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК

Для амплификации длинного (~1450 п. н.) фрагмента гена 16S рРНК использовали праймеры:

27F – 5'-AGAGTTTGATCMTCGCTCAG-3'

1492R – 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

(Lane, 1991; Turner et al., 1999).

Объем пробы для ПЦР составлял 25 мкл и включал в себя по 0,1 мкл прямого и обратного праймеров (конечная концентрация – 80нМ), 1 мкл ДНК-матрицы (10-20 нг ДНК), 5 мкл готовой ПЦР смеси (ScreenMix-HS, Евроген) и 18,8 мкл стерильной воды для ПЦР. Для удобства и точности все компоненты, кроме ДНК-матрицы, смешивали в общем объеме, который высчитывали исходя из количества ПЦР-проб. Затем аликвотами по 24 мкл раствор распределяли по стерильным ПЦР-пробиркам и добавляли ДНК-матрицу.

Амплификация проводилась при следующих условиях:

1. Предварительная денатурация при 95°C, 5 мин;

2. 30 циклов амплификации в режиме: денатурация ДНК при 95°C, 1 мин; отжиг праймеров при 54°C, 30 с; элонгация при 72°C, 1,5 мин;
3. Заключительная стадия элонгации - 72°C, 10 мин.

2.7.2 Амплификация участка внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рибосомного оперона

Для амплификации ITS использовали праймеры:

F1407 – 5'-TGTACACACCGCCCGTC-3'

R – 5'-CTCTGTGTGCCTAGGTATCC-3' (Iteman et al., 2000)

Объем пробы для ПЦР составлял 25 мкл и включал в себя по 0,1 мкл прямого и обратного праймеров (конечная концентрация – 80нМ), 1 мкл ДНК-матрицы (10-20 нг ДНК), 5 мкл готовой ПЦР смеси (ScreenMix-HS, Евроген) и 18,8 мкл стерильной воды для ПЦР. Для удобства и точности все компоненты, кроме ДНК-матрицы, смешивали в общем объеме, который высчитывали исходя из количества ПЦР-проб. Затем аликвотами по 24 мкл раствор распределяли по стерильным ПЦР-пробиркам и добавляли ДНК-матрицу. Амплификация проводилась при следующих условиях:

1. Предварительная денатурация при 94°C, 5 мин;
2. 30 циклов амплификации в режиме: денатурация при 94°C, 45 с; отжиг праймеров при 57°C, 30 с; элонгация при 72°C, 1 мин;
3. Заключительная элонгация при 72°C, 10 мин.

2.8 Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез проводили в 1%-ном агарозном геле (TopVision™ Agarose (Fermentas)) в ТАЕ буфере (40 мМ Tris-ацетат, 2 мМ ЭДТА, рН 8). В качестве интеркалирующего красителя использовали бромистый этидий (конечная концентрация в геле 0,5 мкг/мл).

Образцы тотальной ДНК и очищенные ПЦР-фрагменты (объем 3 мкл) смешивали с красителем-утяжелителем фирмы Fermentas (1 мкл) и вносили в лунки геля. Продукты ПЦР-реакции уже содержали низкомолекулярный краситель и утяжелитель проб, которые входят в состав набора для проведения ПЦР, их вносили в карманы геля в полном объеме. В качестве маркера длин фрагментов ДНК использовали «GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus» (Fermentas). Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон), источник напряжения - Эльф-4 (ДНК-Технология), используя напряжение 100V в течение 30-40 мин. Анализ результатов электрофореза производили с помощью UV трансиллюминатора (2011 Microvue, LKB) и системы гель-документации Gel Imager-2 (Helicon).

2.9 Очистка ПЦР-фрагментов

Для выделения ПЦР-фрагментов генов 16S рРНК и ITS из агарозного геля был использован коммерческий набор NucleoSpin «Gel and PCR Clean-up». ДНК-фрагмент вырезали из геля, помещали в центрифужную пробирку и взвешивали. Добавляли буфер NT1 в количестве 200 мкл на каждые 100 мг геля. Пробу инкубировали 5-10 мин при 50°C до полного растворения геля, используя Heating/Cooling Dry Block CH100 (Biosan), периодически перемешивая на вортексе (Centrifuge&Vortex SkyLine, EMLI).

Раствор помещали в спин-колонку и центрифугировали при 11000 об/мин в течение 30 с. ДНК, адсорбированную на колонке, промывали буфером NT3, добавляя 500-700 мкл буфера и центрифугируя при 11000 об/мин в течение 30 с. Процедуру промывки повторяли 2 раза. Для избавления от оставшегося буфера NT3 проводили центрифугирование при 11000 об/мин в течение 1 мин.

Далее колонку помещали в новую стерильную пробирку, наносили на мембрану 20 мкл элюирующего буфера NE и инкубировали при комнатной температуре 1 мин. Элюированную ДНК собирали центрифугированием при 11000 об/мин в течение 1 мин. Для проверки процедуры очистки проводили электрофорез в агарозном геле. Выделенные фрагменты ДНК отправляли на секвенирование.

2.10 Секвенирование и филогенетический анализ последовательностей

Секвенирование очищенных фрагментов гена 16S рРНК и ITS проводилось на базе ресурсного центра Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» методом капиллярного электрофореза с использованием генетического анализатора ABI310 (Applied Biosystems™) в соответствии с рекомендациями к прибору.

Полученные в результате секвенирования последовательности выравнивали, используя программу ClustalX (Chenna et al., 2003), после чего осуществляли сборку консенсусных последовательностей, которые сравнивали с последовательностями GenBank с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1990).

Филогенетические дендрограммы строили с использованием пакета программ MEGA 5 (Tamura et al., 2011) и алгоритмов neighbor-joining (NJ) (Saitou, Nei, 1987) и Maximum Likelihood (Tamura, Nei, 1993).

2.11 Анализ последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров рибосомного оперона

Последовательности участков внутренних транскрибируемых спейсеров (16S–23S рРНК ITS) исследуемых штаммов сравнивались с опубликованными последовательностями

представителей р. *Geminocystis* и *Synechocystis* с целью выявления консервативных и переменных участков согласно системе, представленной Itemann (Itemann et al., 2000). Гипотетическая вторичная структура ITS анализировалась с использованием программ M-fold (Zuker, 2003; <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) и RNA structure (Mathews et al., 2005; <http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure.html>).

3. Результаты и обсуждение

3.1 Характеристика морфологии и ультраструктуры исследуемых штаммов

Штаммы Кластера «biofilms» являются мелкими одноклеточными цианобактериями, имеющими сферическую или эллипсоидную форму (рис. 3). Согласно данным морфометрии длина клеток варьирует в пределах 1,7-2,9 мкм, ширина – 1,5-1,9 мкм (Карапетян, 2017). В среднем, штаммы Кластера «biofilms» имеют меньшие размеры клеток по сравнению с представителями кластера 2 в составе ф.-р. *Synechocystis*, размеры которых, по данным «Руководства по систематике Берги» (Castenholz, 2001), варьируют от 2 до 4 мкм. Представители Кластера могут образовывать временные пары или тетрады, что свидетельствует о делении со сменой двух перпендикулярных плоскостей (рис. 3).

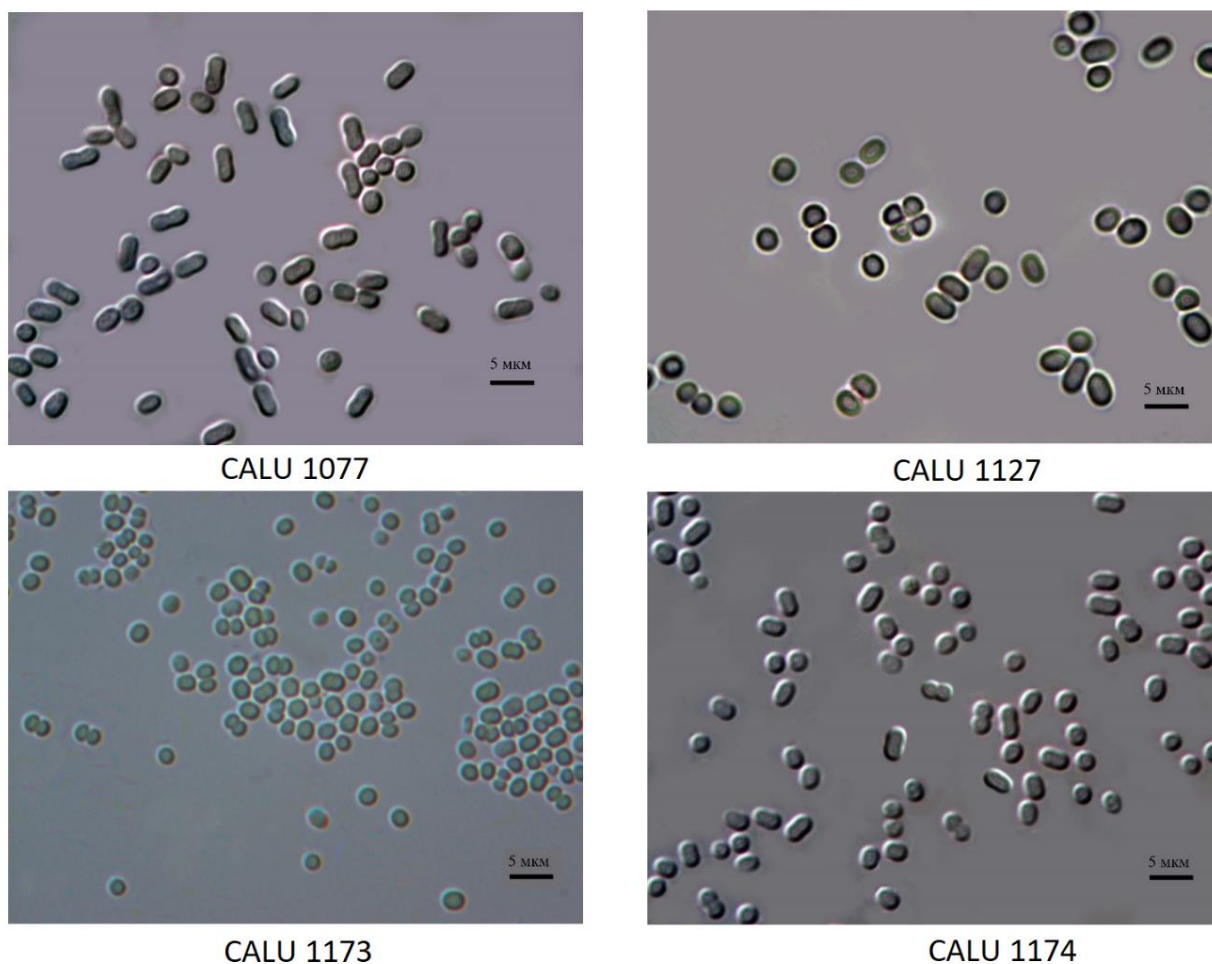


Рисунок 3. Микрофотографии штаммов Кластера "biofilms"; световая микроскопия, дифференциционно-интерференционный контраст.

При анализе ультраструктуры клеток цианобактерий большое внимание уделяется архитектуре внутриклеточных фотосинтетических мембран. У представителей Кластера «biofilms» тилакоиды располагаются концентрическими параллельными кругами на

периферии клетки как на продольных, так и на поперечных срезах (рис. 4). Нуклеоид и карбоксисомы локализованы в центральной части клетки, свободной от фотосинтетических мембран. Такое же расположение тилакоидов наблюдается в клетках кластера 2 ф.-р. *Synechocystis*, куда входит типовой штамм *Synechocystis* sp. PCC6803 (Korelusova et al., 2009).

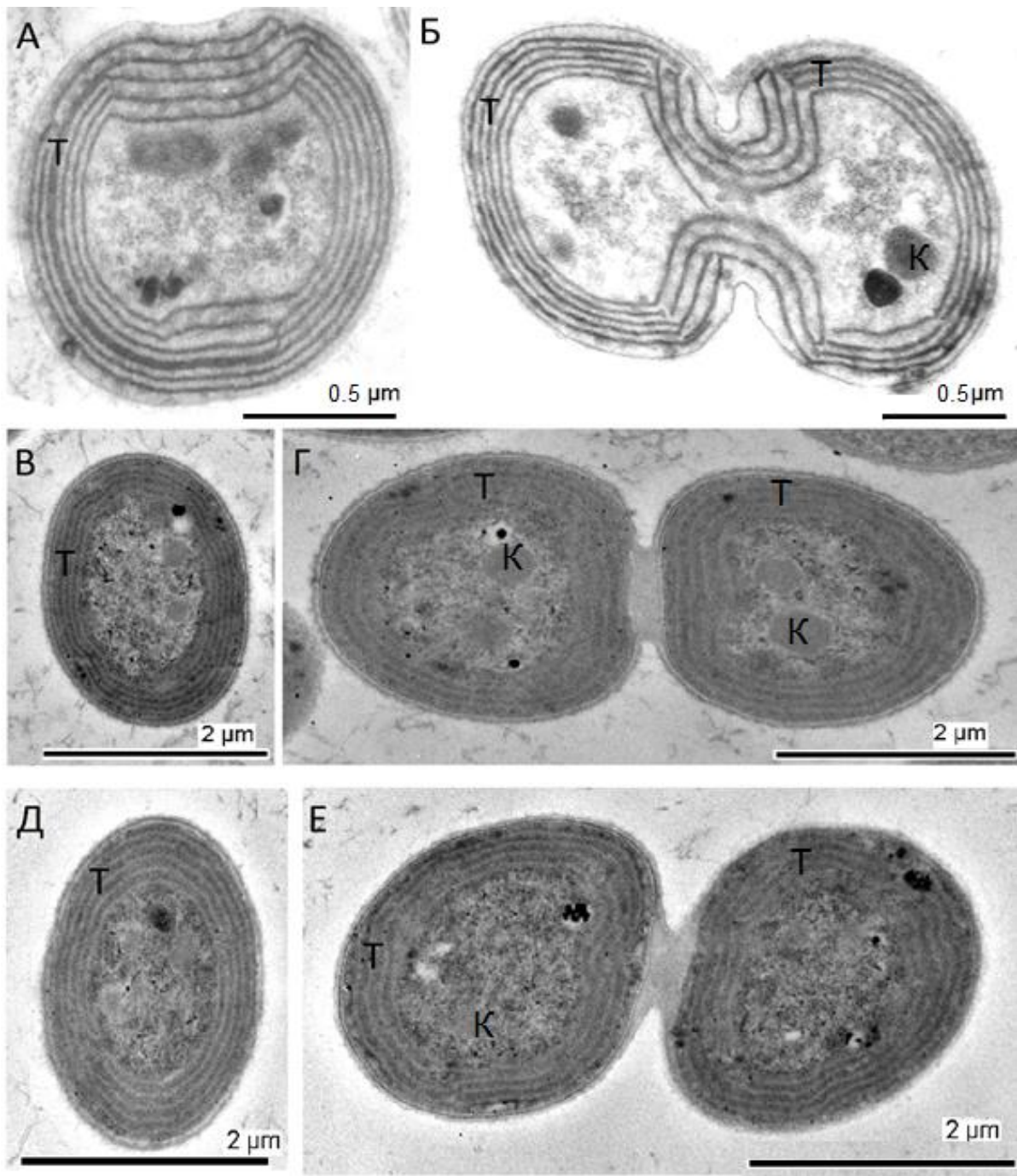


Рисунок 4. Микрофотографии ультратонких срезов клеток штаммов Кластера "biofilms": CALU 1077 (А, Б) (Pinevich et al, 2000); CALU 1173 (В, Г) и CALU 1174 (Д, Е); просвечивающая электронная микроскопия; Т – тилакоиды, К- карбоксисомы (полиэдральные тела). Снимки любезно предоставлены Гавриловой О.В.

Клетки штаммов Кластера «geminocystis» имеют сферическую или эллипсоидную форму (рис. 5) и более крупные размеры по сравнению с клетками представителей предыдущего Кластера: длина варьирует в пределах 3,1-3,5 мкм, ширина – 2,7-3,1 мкм (Карапетян, 2017).

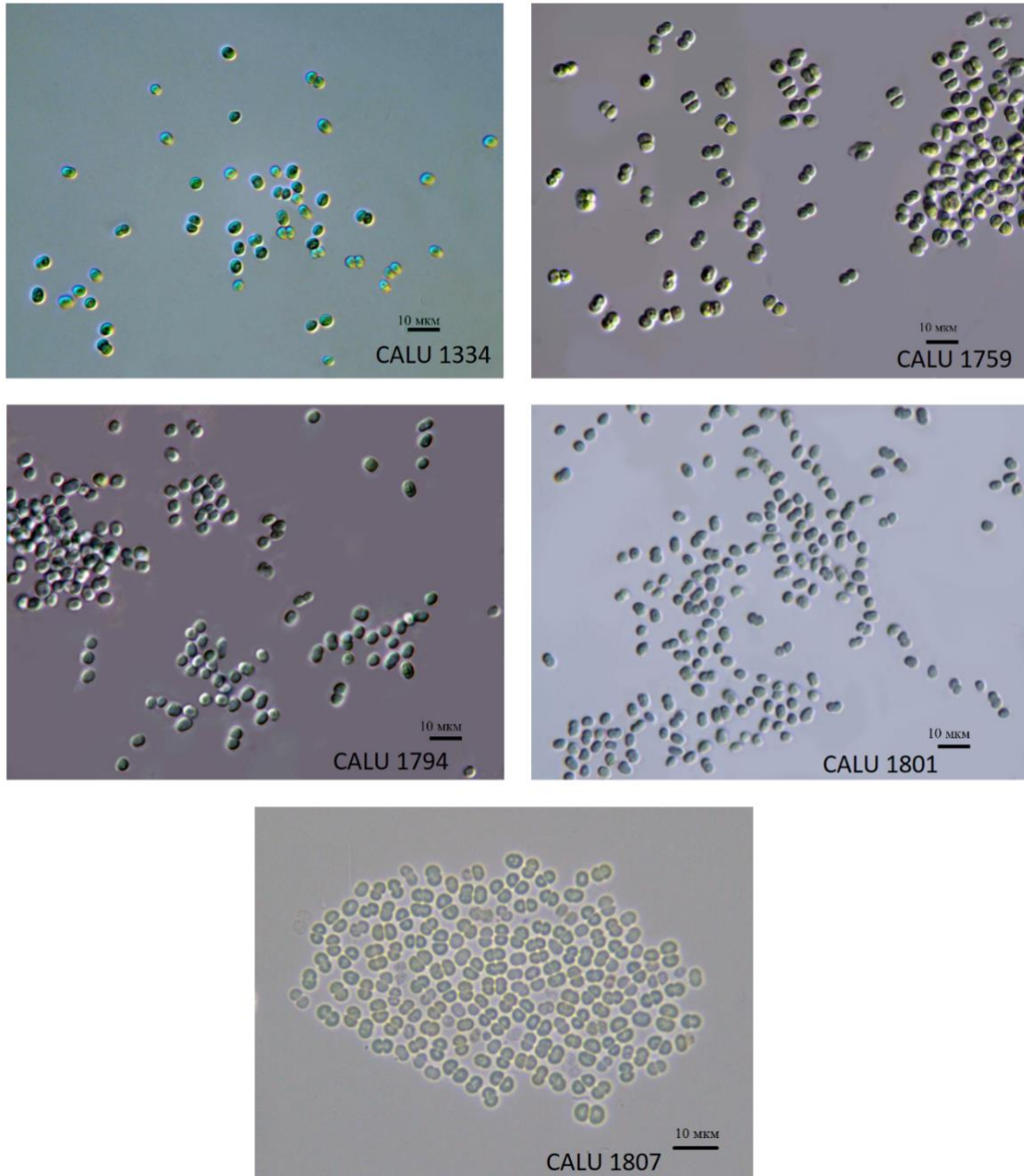


Рисунок 5. Микрофотографии штаммов Кластера "geminocystis"; световая микроскопия, дифференционно-интерференционный контраст.

По своим размерам они не отличаются от представителей кластера 2 ф.-р. *Synechocystis* и попадают в диапазон размеров, установленный для представителей р.

Geminocystis (3-10 мкм), хотя оказываются чуть мельче типового штамма *Geminocystis herdmanii* PCC6308 (3,5-4 мкм) (Korelusova et al., 2009). Штаммы Кластера «geminocystis» размножаются путем бинарного эквивалентного деления со сменой двух перпендикулярных плоскостей, образуя после деления пары или тетрады (рис. 5).

Архитектура внутриклеточных фотосинтетических мембран в клетках представителей Кластера «geminocystis» отличается от описанной выше. Тилакоиды образуют параллельные слои, равномерно распределенные по всему объему клетки, в клетках отсутствует центральная область, свободная от фотосинтетических мембран (рис. 6). Подобное расположение тилакоидов выявляется у представителей р. *Geminocystis*, в том числе и у типового штамма *Geminocystis herdmanii* PCC6308 (Korelusova et al., 2009).

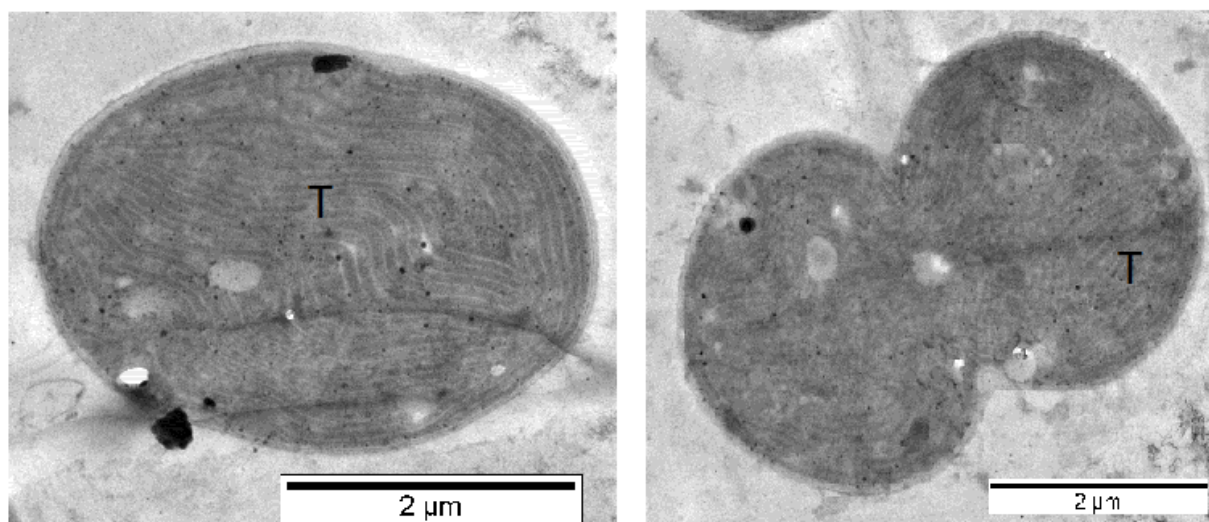


Рисунок 6. Электронные микрофотографии ультратонких срезов клеток штамма CALU 1334; просвечивающая электронная микроскопия; Т – тилакоиды. Снимки любезно предоставлены Гавриловой О.В.

3.2 Хроматическая адаптация исследуемых штаммов

Для предварительной оценки типа хроматической адаптации исследуемых штаммов, мы культивировали их, используя зеленый и красный светофильтры для изменения качества освещения.

Все штаммы Кластера «biofilms» показывали увеличение содержания ФЭ при росте на зеленом свете (рис. 7). При освещении красным светом количество ФЭ в клетках уменьшалось. Только один штамм - CALU 1077 - показал увеличение ФЦ при росте на красном свете, у остальных штаммов содержание этого пигмента не подвергалось сильным изменениям (рис. 7). Используя классификацию, предложенную Tandeau de Marsac для штаммов, содержащих ФЭ и ФЦ (Tandeau de Marsac, 1977), штаммы CALU 1127, CALU 1173

и CALU1174 проявляют второй тип хроматической адаптации - САII. Установлено, что CALU 1077 обладает хроматической адаптацией третьего типа (САIII).

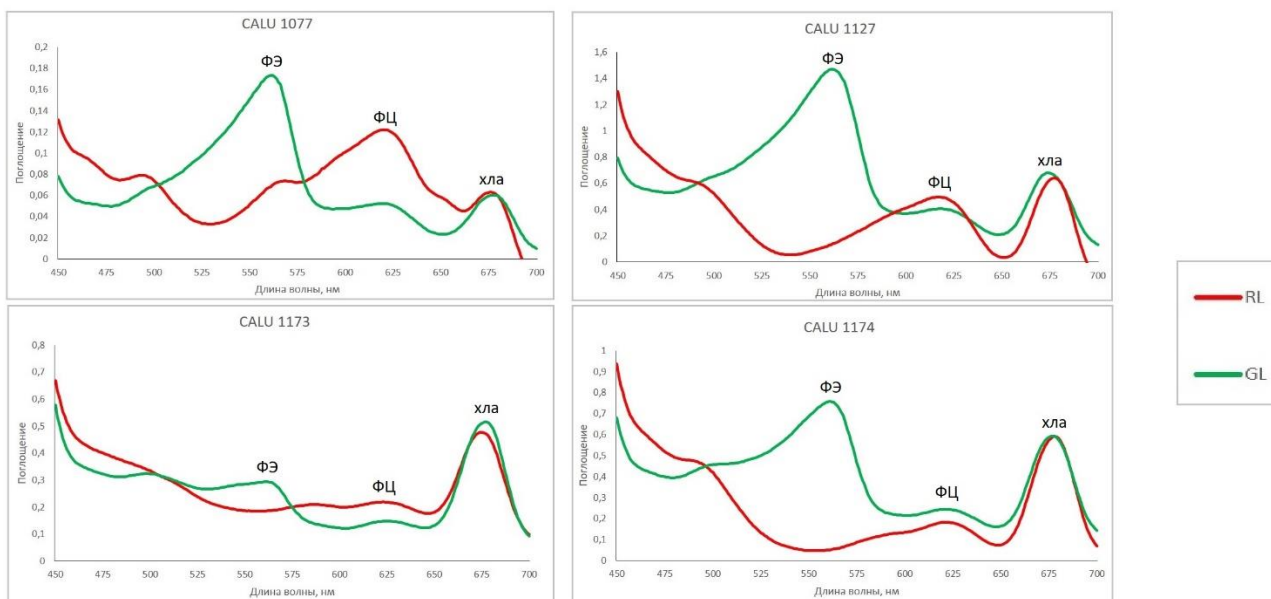


Рисунок 7. Спектры поглощения штаммов Кластера "biofilms". ФЭ – фикоэритрин, ФЦ – фикоцианин, хла – хлорофилл а.

У всех штаммов Кластера «geminocystis», кроме CALU 1794, наблюдалось увеличение содержания ФЭ и ФЦ при росте с использованием зеленого света, по сравнению с ростом под красным светофильтром (рис. 8). У штамма CALU 1794 содержание ФЦ не изменялось в зависимости от качества освещения.

Третий тип хроматической адаптации согласно системе, предложенной Tandeau de Marsac (1977), характеризуется повышением содержания фикоэритрина и уменьшением содержания фикоцианина на зеленом свете, а на красном свете наблюдается обратная динамика. В нашем случае под красным светофильтром клетки перестают вырабатывать ФЦ, а уменьшения количества ФЦ на зеленом свете не происходит. Стоит отметить, что при культивировании наших штаммов под светофильтрами интенсивность света была достаточно высокой (500 лк). Возможно, что в этих условиях при освещении красным светом клеткам было достаточно хлорофилла а (с максимумом поглощения 680 нм) для улавливания световой энергии и не было необходимости синтезировать дополнительно ФЦ.

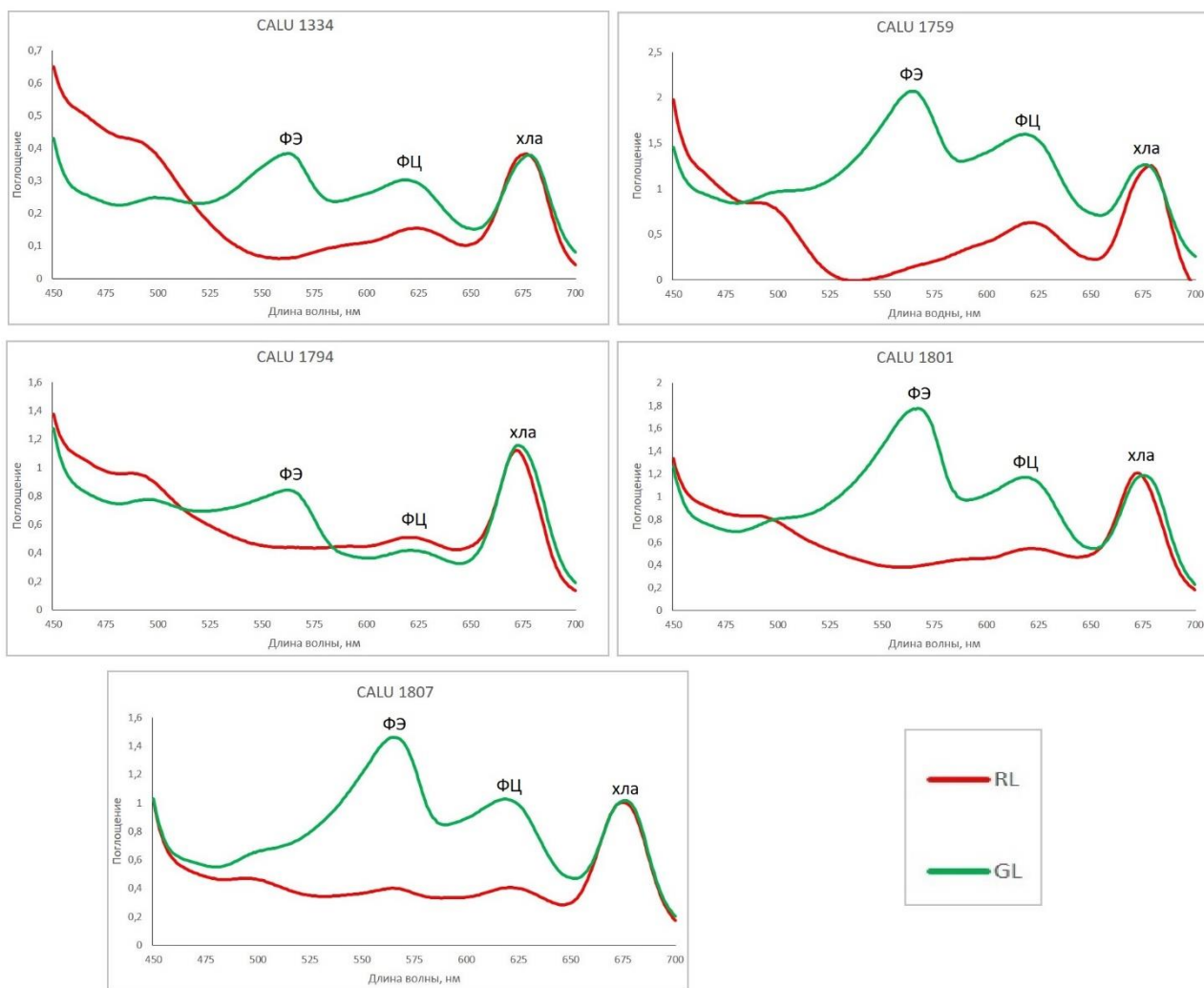


Рисунок 8. Спектры поглощения штаммов Кластера "biofilms". ФЭ – фикоэритрин, ФЦ – фикоцианин, хла – хлорофилл а.

Поэтому можно сделать предварительный вывод о том, что все штаммы Кластера «geminocystis» имеют способность ко второму типу хроматической адаптации. Необходимо добавить, что в литературе описывается способность представителей р. *Geminocystis* осуществлять второй тип хроматической адаптации: в «Руководстве по систематике Берги» некоторые штаммы кластера 1 р. *Synechocystis*, позднее описанного как новый альгологический р. *Geminocystis*, обладают ФЭ и склонны к САП, в то время как другие штаммы, в том числе типовой штамм PCC6308, не синтезируют ФЭ (Castenholz, 2001). Второй тип хроматической адаптации у штаммов р. *Geminocystis* из коллекции NIES подтверждается данными анализа генома (Hirose et al., 2015). Однако, для уточнения полученных результатов и подтверждения типа хроматической адаптации у штаммов Кластера «geminocystis» необходимы дополнительные серии опытов.

3.3 Рост исследуемых штаммов при различном уровне солености среды

Одним из важных экологических и физиологических признаков, рассматриваемых при характеристике таксонов уровня рода и вида у цианобактерий, является их отношение к уровню солености среды обитания и способность адаптироваться к его изменению. Известно, что стеногалинные формы организмов способны переносить лишь небольшие колебания солености, а эвригалинные организмы существуют в широком диапазоне солености, легко адаптируясь к изменениям концентрации NaCl (Дедю, 1989).

Для оценки способности исследуемых штаммов расти при различном уровне солености, проводили их культивирование в средах с разной концентрацией NaCl. Несмотря на то, что в отдельных экспериментах абсолютные значения величин оптической плотности суспензий варьировали, сохранялась общая для каждого штамма тенденция в накоплении биомассы при различной солености. На рис. 9 и 11 приведены графики зависимости накопления биомассы от содержания NaCl в отдельных экспериментах.

В Кластере «biofilms» все штаммы демонстрировали наиболее активный рост в контроле (рис. 9). Штаммы CALU1077 и CALU1174, в меньшей степени по сравнению с контролем, показали высокие значения биомассы к концу большинства экспериментов на среде с добавлением 0,3% NaCl (рис. 9: А, Г). У всех изученных штаммов не наблюдалось большого прироста биомассы на средах с добавлением 1%, 2% и 3,5% NaCl (рис. 9).

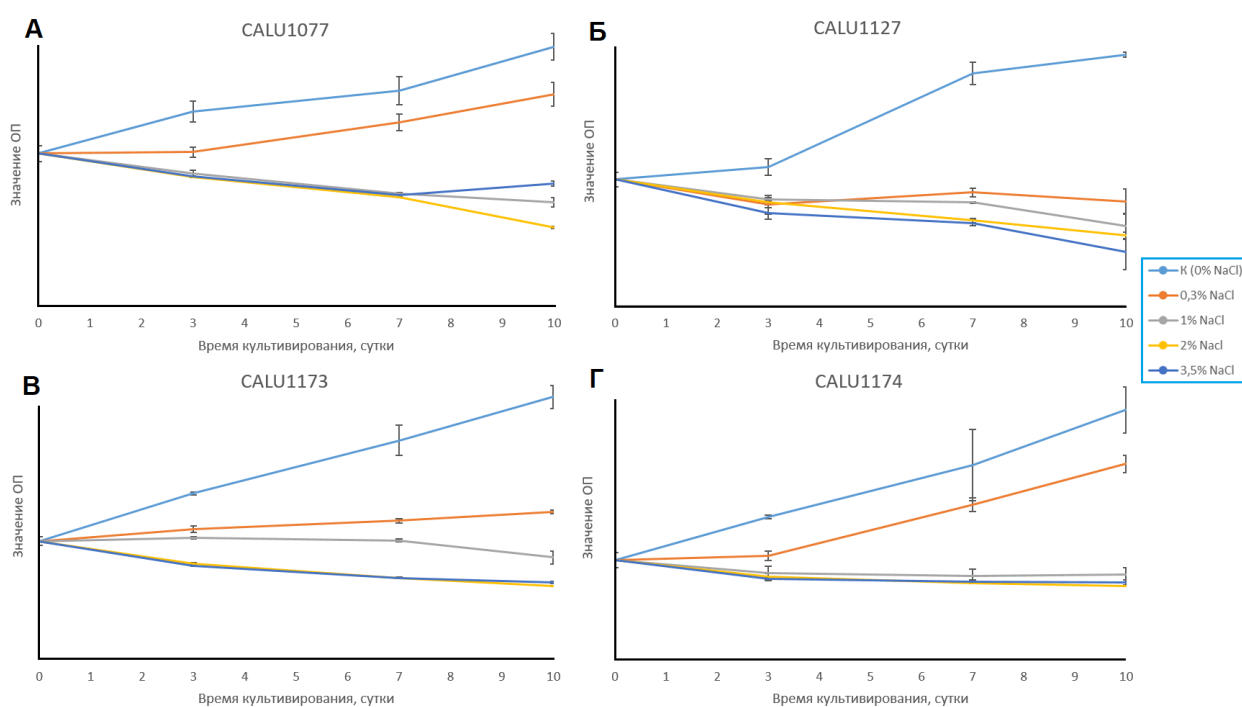


Рисунок 9. Рост штаммов Кластера «biofilms» на средах с различным содержанием NaCl.

С полученными данными был проведен кластерный анализ. После для дальнейшего обсуждения брали только те частные уравнения, коэффициент детерминации которых превышал 0,6 (60%). Контрольная группа во всех достоверных экспериментах образовывала у всех исследуемых штаммов отдельный кластер (рис. 10). У штаммов CALU1077 и CALU1174 контрольная группа образовывала единый кластер с группой, растущей на среде с добавлением 0,3% NaCl (рис. 10: А, Б). Однако, согласно авторам методики и данным по её практическому применению, различие F/Fкр в 0,5 единиц по обе стороны от 1 (граница F-критерия) недостаточно статистически значимо, и поэтому говорить о достоверных отличиях или сходстве групп, если значения находятся в этих пределах, нельзя. Контроль и группа, выращиваемая на среде с добавлением 0,3% NaCl, штаммов CALU 1077 и CALU 1174 достоверно отличаются от других групп, но образуемый ими единый кластер находится под вопросом.

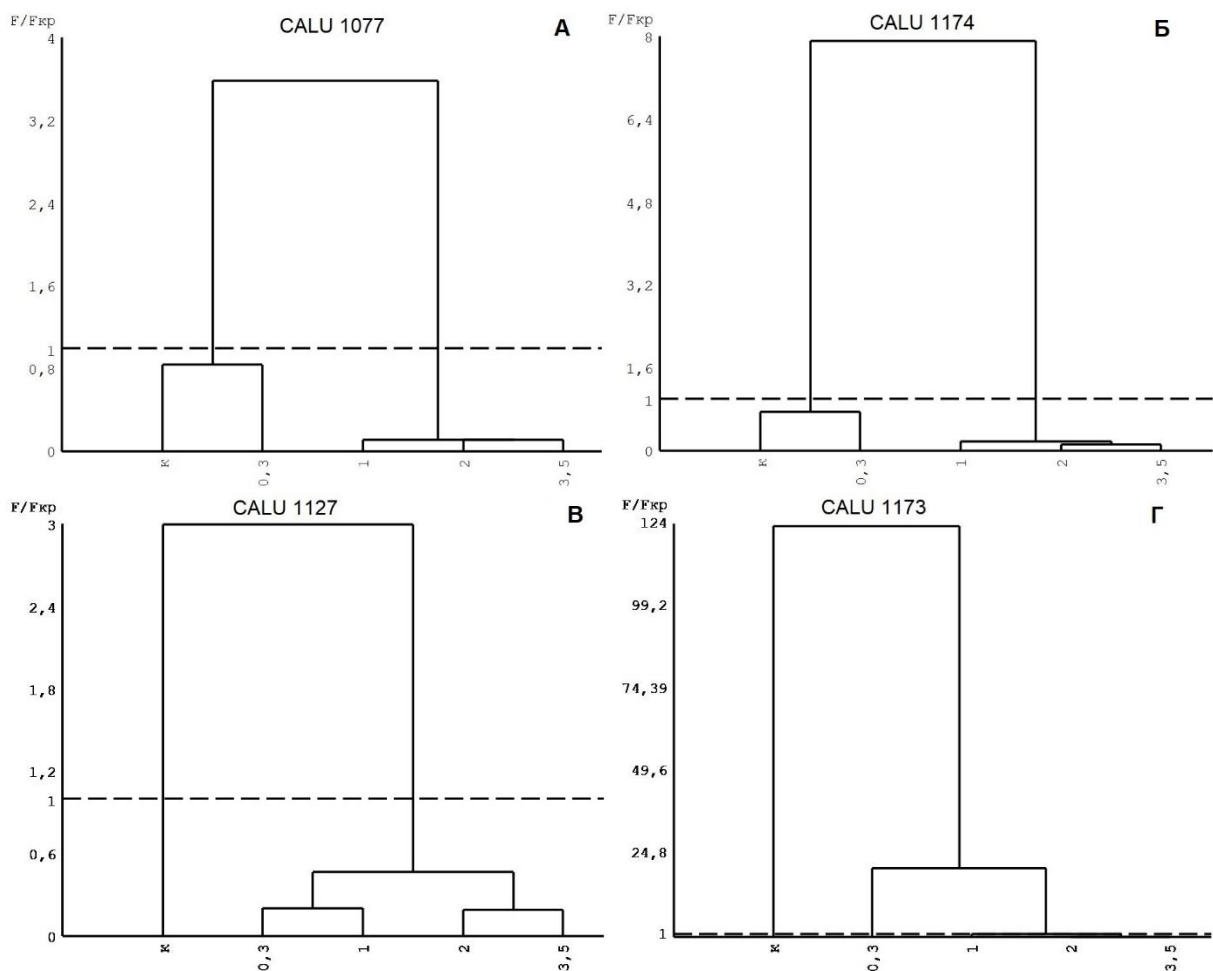


Рисунок 10. Кластерный анализ штаммов Кластера "biofilms".

В Кластере «geminocystis» также у всех штаммов наблюдался активный рост в контрольной группе (рис. 11). На средах с добавлением 1%, 2% и 3,5% NaCl прироста биомассы либо не было замечено (рис. 11: В, Г, Д), либо он был меньше по сравнению с контрольной группой (рис. 11: А, Б).

По результатам кластерного анализа, контрольная группа всех штаммов достоверно образовывала отдельный кластер (рис. 12).

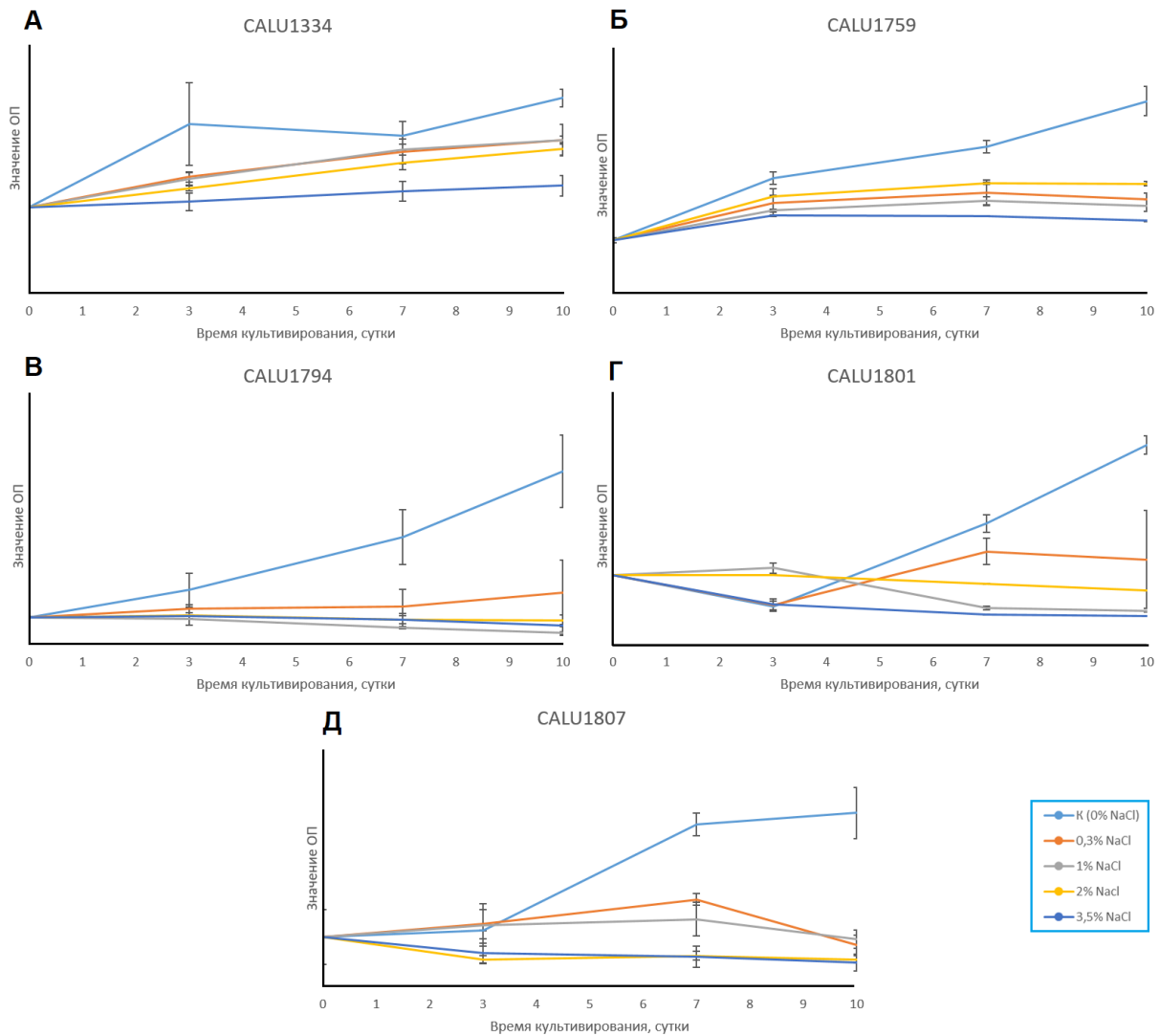


Рисунок 11. Рост штаммов Кластера «geminocystis» на средах с различным содержанием NaCl.

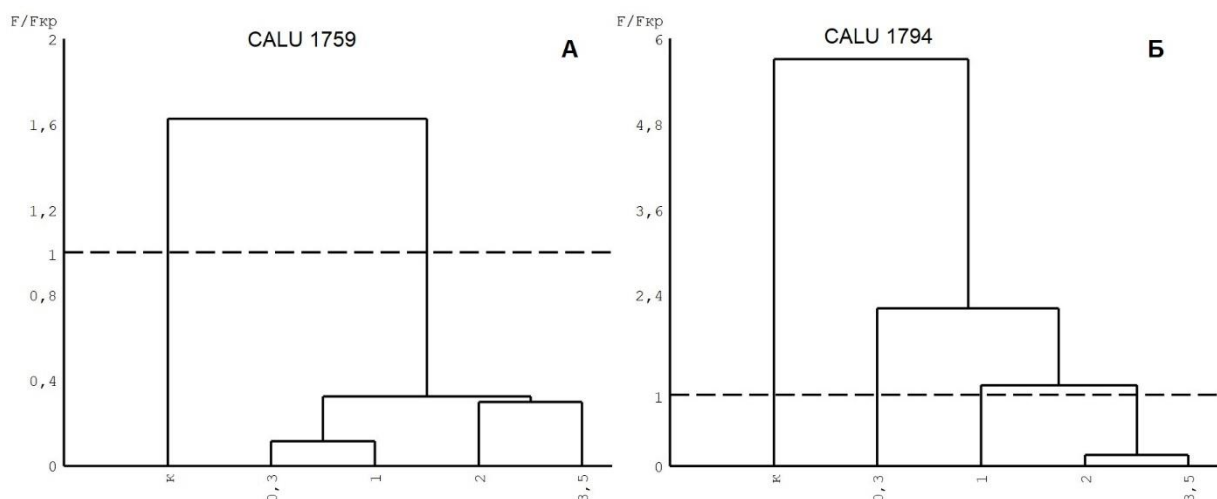


Рисунок 12. Кластерный анализ двух штаммов Кластера "*geminocystis*": CALU1759 и CALU1794.

Согласно концепции критической солености, зона разделения пресноводных и морских организмов находится в диапазоне 5-8‰, различаясь для каждого водоема (Хлебович, 1974; Хлебович, 2012). Принимая во внимание множество практических примеров, когда разделение морской и пресноводной фаун происходило в этом узком диапазоне, а также данные о разном характере физико-химических процессов, протекающих по обе стороны, Kinne (Kinne, 1971) предложил назвать эту зону хорогалинной (от греч. - разделяю). Исходя из этой концепции, мы можем назвать все исследуемые нами штаммы пресноводными стеногалинными организмами с низкой солеустойчивостью. Это отличает их от кластера 2 р. *Synechocystis*, куда входит и типовой штамм PCC6803, представители которого являются эвригалинными (Castenholz, 2001), но сближает с кластером 1 р. *Synechocystis*, впоследствии описанным как отдельный р. *Geminocystis* (Korelusova et al., 2009). Кроме того, полученные нами результаты согласуются с местами выделения штаммов - озера Ладожское и Корочкое, пресные прибрежные воды Финского залива.

3.4 Молекулярно-филогенетический анализ исследуемых штаммов

Молекулярно-филогенетический анализ исследуемых штаммов проводился на основе практически полноразмерной последовательности гена 16S рРНК (1334-1389 п.н.). Последовательности изучаемых штаммов приведены в Приложении 1.

Кластер, условно обозначенный нами «biofilms», включает 4 штамма: CALU 1077, CALU 1127, CALU 1173 и CALU 1174. Уровень взаимного сходства штаммов кластера неодинаков: он составляет 99,78% между штаммами CALU 1127 и CALU 1174 и гораздо ниже (97,3-97,8%) для остальных попарных сравнений (таблица 1).

Таблица 1. Уровень взаимного сходства последовательностей генов 16s рРНК штаммов Кластера «biofilms».

	1077	1127	1173	1174
1077	-	97,43%	97,39%	97,30%
1127	97,43%	-	97,58%	99,78%
1173	97,39%	97,58%	-	97,30%
1174	97,30%	99,78%	97,30%	-

При сравнении последовательностей штаммов кластера «biofilms» с последовательностями из GenBank установлено, что их ближайшими гомологами (с 97-98% сходства) являются некультивируемые цианобактерии с неизвестными фенотипическими признаками (приложение 2: табл. 1). Последовательности 16S рРНК, наиболее близкие по гомологии (Llo_56 и Llo_53), были обнаружены в биопленках высокогорных озер. Другими источниками высокогомологичных последовательностей были образцы ДНК, выделенные из почвы, лесных рек и биопленок карстовых потоков. Среди культивируемых цианобактерий ближайшими гомологами штаммов CALU 1077, CALU 1127, CALU 1173 и CALU 1174 являются трихомные представители: р.*Schizothrix* (92%), р. *Pseudanabaena* (91-92%) (приложение 2: табл. 1).

Кластер, условно обозначенный нами «geminocystis», включает 5 штаммов: CALU 1334, CALU 1759, CALU 1794, CALU 1801 и CALU1807. Процент взаимного сходства всех штаммов достаточно высокий – минимальное значение составляет 98,62% (таблица 2).

Таблица 2. Уровень взаимного сходства последовательностей генов 16s рРНК штаммов Кластера «geminocystis».

	1334	1759	1794	1801	1807
1334	-	99,78%	99,56%	98,83%	99,78%
1759	99,78%	-	99,63%	98,83%	99,71%
1794	99,56%	99,63%	-	98,62%	99,49%
1801	98,83%	98,83%	98,62%	-	98,69%
1807	99,78%	99,71%	99,49%	98,69%	-

Ближайшими гомологами штаммов Кластера оказались последовательности 16S штаммов *Geminocystis* sp. из коллекции NIES (96-98%) и других штаммов р. *Geminocystis*, представленных в базе данных Genbank (95-97%) при перекрытии 99-100% (приложение 2: табл. 2). С типовым штаммом рода - *Geminocystis herdmanii* PCC 6308, процент идентичности

составлял 95-96% при перекрывании 99-100% (приложение 2: табл. 2). Помимо этого, отмечалось высокое сходство последовательностей с последовательностями гена 16S рНК других родов одноклеточных цианобактерий: р. *Cyanobacterium* (95-96%), р. *Synechococcus* (95-96%).

Процент сходства последовательностей всех исследуемых нами штаммов с последовательностью типового штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 относительно низкий. Для Кластера «biofilms» он составляет 88% при перекрывании 99-98%, для Кластера «geminocystis» - 89-90% при перекрывании 97-98% (приложение 2: табл. 1 и 2). Учитывая эти данные, можно однозначно отделить исследуемые штаммы от р. *Synechocystis*, куда изначально они были отнесены на основе морфологических и физиологических критериев.

Для построения филогенетических деревьев, кроме последовательностей изучаемых штаммов, из базы GenBank NSBI были взяты 23 последовательности гена 16S рНК представителей одноклеточных цианобактерий. Для укоренения дерева в качестве внешней группы (outgroup) использовали последовательности *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 и *Chlorobium tepidum* TLS1. Филогенетическое древо строили в программе MEGA 5 (Tamura, 2011) с использованием методов Neighbor-Joining (рис. 13) и Maximum Likelihood (рис. 14). Деревья, построенные с использованием этих методов, не отличаются по топологии и незначительно отличаются по проценту поддержки ветвей.

Ранее проведенный молекулярно-филогенетический анализ на основе короткого фрагмента гена 16S рНК показал, что штаммы CALU 1077, CALU 1127, CALU 1173 и CALU 1174 образовывали единую группу (Карапетян, 2017). То же самое наблюдалось и в отношении штаммов CALU 1334, CALU 1759, CALU 1794, CALU 1801 и CALU1807. Обе группы штаммов располагались дистантно от кластера *Synechocystis sensu stricto*, включающего типовой штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803. Проведенный нами молекулярно-филогенетический анализ подтвердил наличие этих двух групп (рис. 13 и рис. 14).

На филогенетическом древе представители Кластера «biofilms» образуют сестринскую группу по отношению к представителю р. *Synechococcus* - *Synechococcus* sp. PCC 6312 (рис. 13 и рис. 14). Этот штамм был выделен из пресного водоема в Калифорнии (США) в 1963 году, согласно «Руководству Берги по систематике...» входит в состав Кластера 1 месте со штаммом *Synechococcus* sp. PCC6301 и отличается низкой солеустойчивостью (Castenholz, 2001). Однако анализ последовательностей различных штаммов, отнесенных к р. *Synechococcus*, позволяет выделить 12 филогенетических линий (Dvorak et al., 2014), локализованных дистантно, причем штаммы PCC 6312 и PCC6301 относятся к разным линиям (линия 6 и 10 соответственно). Представители Кластера «biofilms» имеют лишь 90% сходства гена 16S рНК с последовательностью PCC 6312, что

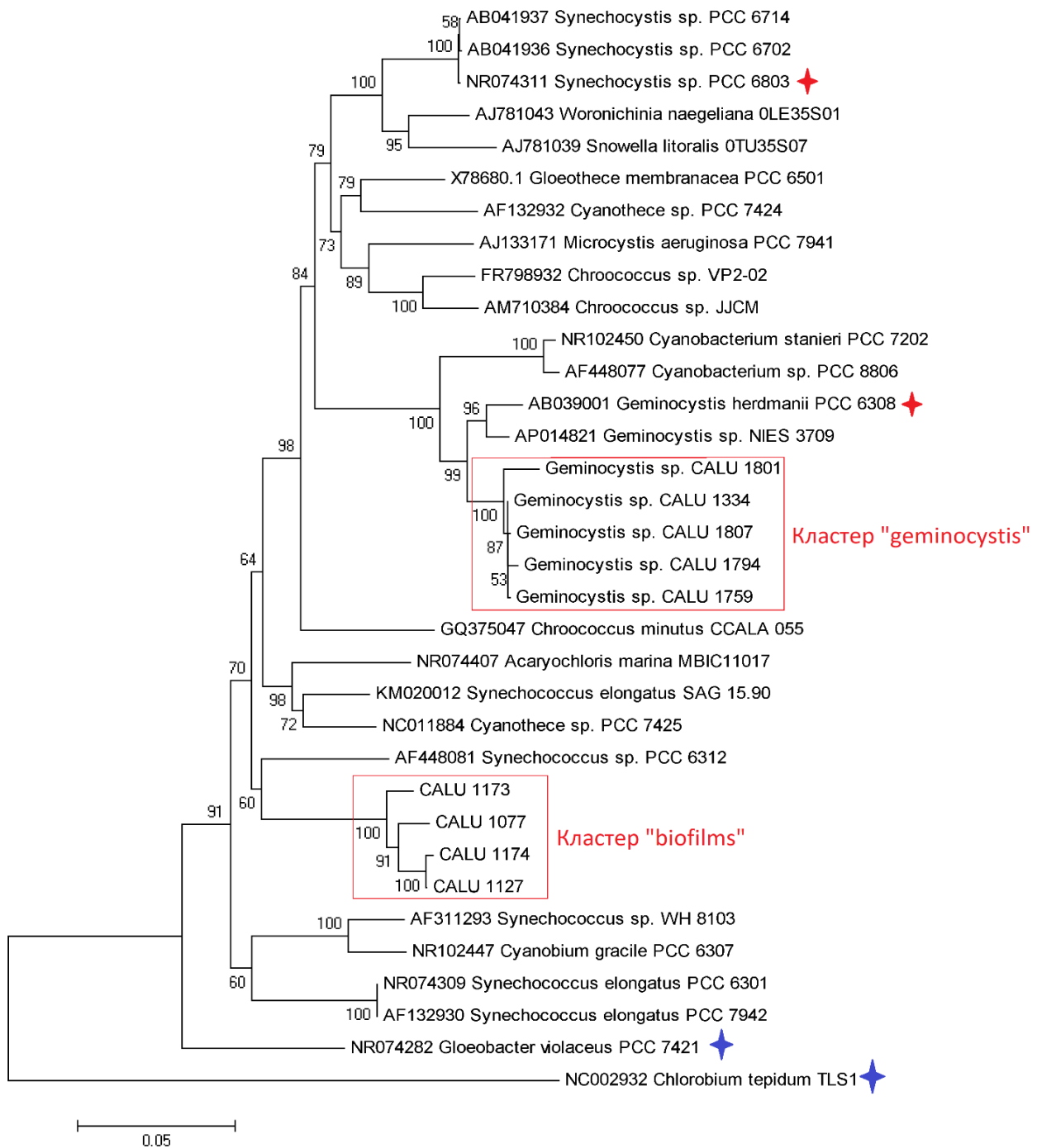


Рисунок 13. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) при анализе 34 последовательностей гена 16S рРНК. Показано оптимальное дерево с суммарной длиной ветвей = 1.10046227. Процентами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев, установленная с помощью bootstrap-анализа (значения менее 50% не показаны). Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием метода Maximum Composite Likelihood (Tamura et al., 2004). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Все позиции в последовательностях, содержащие пробелы и пропущенные данные, были исключены. Всего в итоговом наборе данных было 1302 позиции. Эволюционный анализ был проведен в MEGA5 (Tamura et al., 2011). Красными звездами обозначены типовые штаммы *p. Synechocystis* и *p. Geminocystis*, синими – аутгруппы.

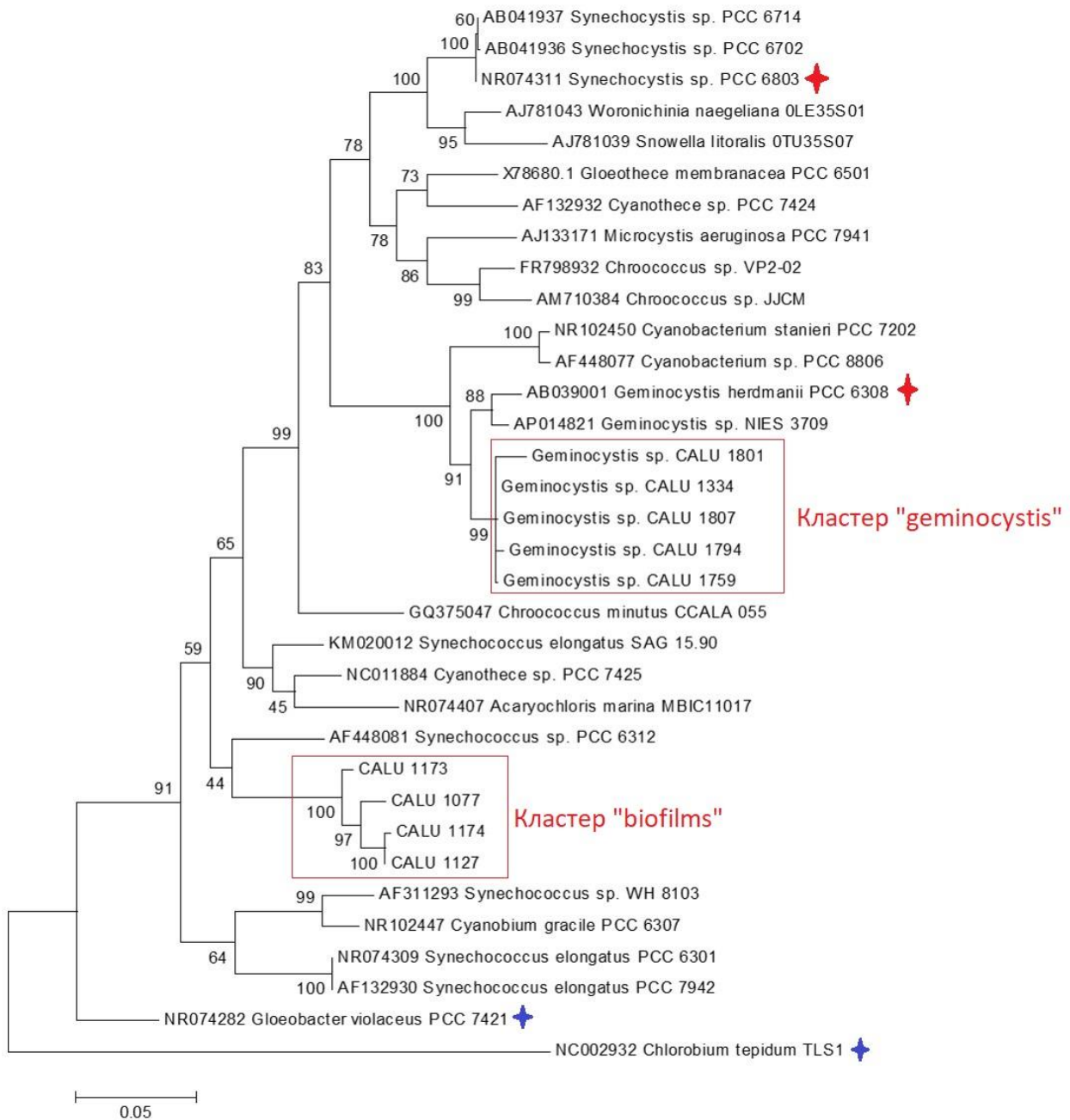


Рисунок 14. Филогенетическое дерево, построенное с использованием метода Maximum Likelihood, основанного на модели Тамура-Ней (Tamura, Nei, 1993), при анализе 34 последовательностей гена 16S рРНК. Наибольшее логарифмическое правдоподобие составило -9926. 2204. Процентами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев, установленная с помощью bootstrap-анализа. Исходные деревья для эвристического поиска были получены автоматически, с применением алгоритмов Neighbor-Join и BioNJ к матрице попарных расстояний, оцененных с использованием подхода максимального составного правдоподобия (MCL), и с выбором топологии с более высоким значением логарифмического правдоподобия. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Все позиции, содержащие пробелы и пропущенные данные, были исключены. Всего в итоговом наборе данных было 1302 позиции. Красными звездами обозначены типовые штаммы *p. Synechocystis* и *p. Geminocystis*, синими – аутгруппы.

позволяет выделить этот кластер как новый таксон уровня рода (приложение 2: табл. 1). Внутри кластера штаммы CALU 1127 и CALU 1174 формируют единую группу, в то время как штаммы CALU 1077 и CALU 1173 образуют отдельные ветви (рис. 13 и рис. 14).

Исходя из современных данных по уровню сходства штаммов одного вида (98,2-99,0% и выше) (Kim et al., 2014) и результатам молекулярно-филогенетического анализа штаммов Кластера «biofilms», можно утверждать о наличии в Кластере трех таксонов уровня вида: первый содержит штаммы CALU 1127 и CALU 1174, второй - CALU 1077, третий - CALU 1173. Сам Кластер можно выделить как новый таксон уровня рода.

Представители Кластера «geminocystis» образуют единую группу с представителями р.*Geminocystis*, в том числе и с типовым штаммом *Geminocystis herdmanii* PCC 6308, и с представителями близкого к р. *Geminocystis*, р. *Cyanobacterium*. Исходя из вышеизложенного, мы можем утверждать, что Кластер «geminocystis» входит в состав р. *Geminocystis*, а р. *Cyanobacterium* является родственным по отношению к исследуемым нами штаммам. Штамм CALU 1801 более всего отделен от остальных штаммов, но исходя из процента гомологии, не может быть выделен как отдельный вид (рис. 13 и рис. 14, табл. 2).

Молекулярно-филогенетический анализ штаммов Кластера «geminocystis» не позволяет их включить в один из ранее описанных видов р. *Geminocystis*. Анализ взаимного сходства последовательностей штаммов Кластера дает нам возможность утверждать о принадлежности их к одному виду. По этим причинам, мы можем описать Кластер «geminocystis» как новый вид р. *Geminocystis*.

3.5 Особенности организации участков внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) рибосомного оперона

Для выяснения таксономического статуса исследуемых штаммов и выделения новых таксонов уровня вида проводился анализ последовательностей 16S-23S рРНК межгенного внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) (см. приложение 1). Нами оценивалась общая длина ITS и наличие транспортных РНК (таб. 3), а также вторичная структура нескольких маркерных доменов: D1-D1', V2, B-box и V3 (Iteman et al., 2000). Исходя из литературных примеров (Johansen et al., 2011; Munlsteinova et al., 2014; Mareš et al., 2019), выделение и сравнение вторичной структуры доменов D1-D1' и B-box производилось с использованием консервативных участков, обнаруженных Iteman (Iteman et al., 2000). Для сравнения были взяты последовательности 16S-23S ITS штаммов *Synechocystis* sp. PCC6803 и *Geminocystis herdmanii* PCC 6308 из базы данных Genbank.

Таблица 3. Характеристика последовательностей 16S-23S ITS штаммов Кластера «biofilms» и «geminosystis» и типовых штаммов.

Штамм	Длина участка ITS (п.н.)	Наличие последовательностей тРНК	Наличие региона V2
CALU1077	543	Иле, Ала	+
CALU1127	512	Иле, Ала	–
CALU1173	508	Иле, Ала	–
CALU1174	513	Иле, Ала	–
CALU1334	364	Иле, Ала	+
CALU1759	364	Иле, Ала	+
CALU1794	363	Иле, Ала	+
CALU1801	364	Иле, Ала	+
CALU1807	363	Иле, Ала	+
PCC 6803	465	Иле	–
PCC 6308	331	Иле, Ала	–

Последовательности 16S-23S ITS штаммов Кластера «biofilms» отличались от последовательности 16S-23S ITS типового штамма рода *Synechocystis* sp. PCC6803. Длина спейсерного участка варьировала и составляла 508-543 нуклеотидов против 465 нуклеотидов у PCC6803 (табл. 3). В составе ITS представителей Кластера «biofilms» обнаруживались две тРНК: изолейцина и аланина, в то время как у PCC6803 присутствует только одна тРНК изолейцина (Iteman et al., 2000; Kaneko et al., 1995,1996). Особенностью штамма CALU1077 является присутствие домена V2, не обнаруженного у других штаммов и у PCC6803 (приложение 1: рис. 1, 2, 3 и 4).

Маркерный участок D1-D1' имеет идентичную вторичную структуру у штаммов CALU1077, CALU1127 и CALU1174 и уникален для штамма CALU 1173 Кластера «biofilms» (рис. 15). У всех указанных штаммов он сильно отличается по своей структуре от домена D1-D1' штамма PCC6803.

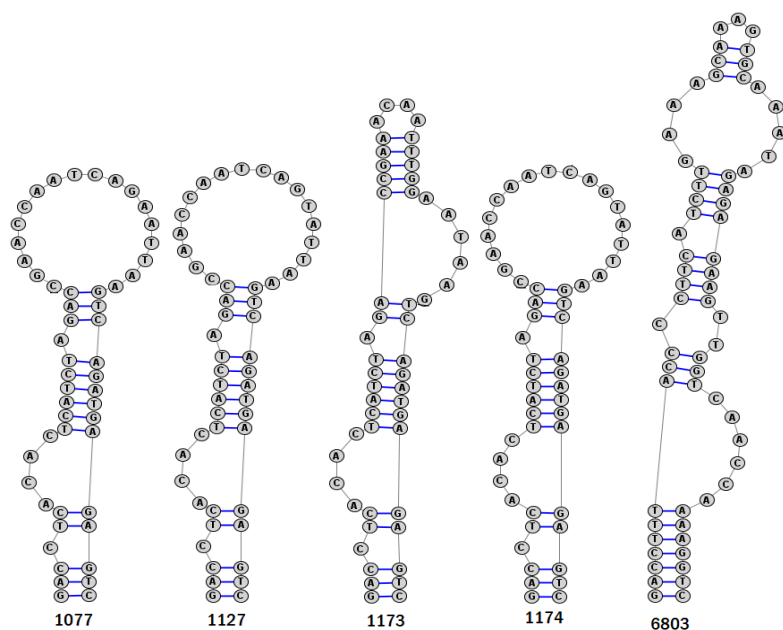


Рисунок 15. Вторичная структура домена D1-D1' штаммов Кластера «biofilms» и *Synechocystis* sp. PCC6803.

Участок В-бок отличается большей вариабельностью: он уникален для CALU1077 и CALU 1173, и идентичен лишь у двух штаммов Кластера «biofilms» - CALU1127 и CALU1174 (рис. 16). Кроме того, этот участок имеет большую длину в сравнении с PCC6803.

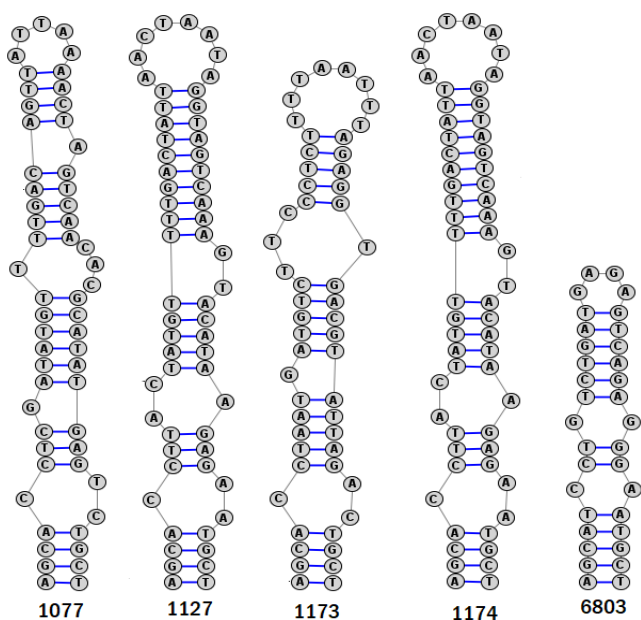


Рисунок 16. Вторичная структура домена В-бок штаммов Кластера «biofilms» и *Synechocystis* sp. PCC6803.

Домен V3 идентичен у всех штаммов Кластера «biofilms», он короче и сильно отличается по вторичной структуре от аналогичного участка ITS PCC6803 (рис. 17).

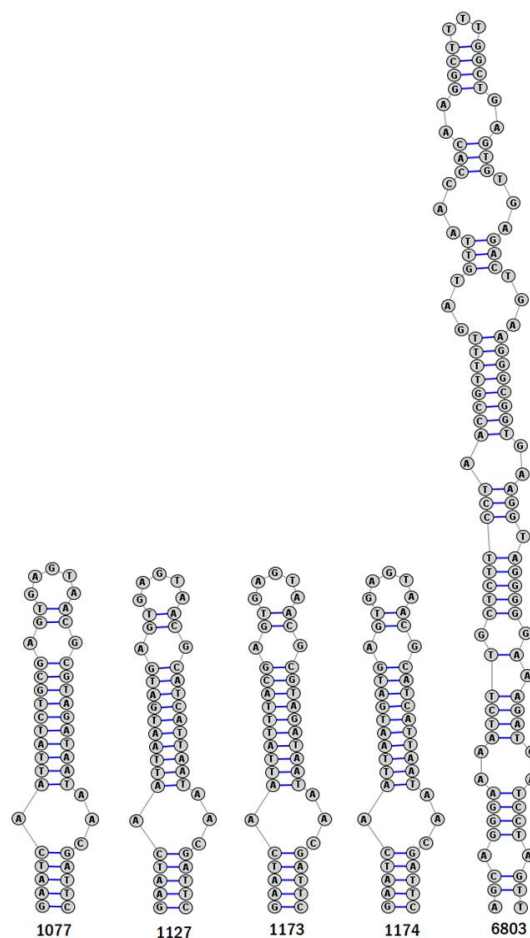


Рисунок 17. Вторичная структура домена V3 штаммов Кластера «biofilms» и *Synechocystis* sp. PCC6803.

Таким образом, 16S-23S ITS штаммов Кластера «biofilms» отличаются от 16S-23S ITS типового штамма *Synechocystis* sp. PCC6803 как по длине последовательности и наличию тРНК, так и по вторичной структуре консервативных и вариабельных доменов. Эти данные подтверждают наше предположение об уникальности представителей данного кластера, а также вывод о том, что штаммы CALU1127 и CALU1174 являются близкородственными в пределах одного вида, а штаммы CALU1077 и CALU 1173 являются отдельными видами.

Длина последовательностей 16S-23S ITS представителей Кластера «geminocystis» составляет 363-364 нуклеотида. Эти значения меньше по сравнению с типовым штаммом рода *Synechocystis* PCC6803 (465 н.), но близки по размерам к типовому штамму рода *Geminocystis* PCC6308 (331 н.). В последовательностях Кластера «geminocystis» также обнаруживаются две тРНК (изолейцина и аланина), что отличает их от ITS *Synechocystis* sp. PCC6803, но дает сходство с *Geminocystis herdmanii* PCC6308, у которого также выявлены

две тРНК (изолейцина и аланина) в составе ITS (Korelusova et al., 2009). Домен V2 присутствует у всех штаммов Кластера «geminocystis» (приложение 2: рис. 5, 6, 7, 8 и 9), что отличает их от ITS PCC6803 и PCC6308, у которых этот домен отсутствует.

Структура участка D1-D1' идентична у всех штаммов Кластера «geminocystis» (рис. 18). Он сильно отличается аналогичного участка штамма PCC6803. Особенностью петли D1-D1' у Кластера «geminocystis» является то, что она не фланкирована консервативными участками и не включает их в свой состав, хотя эти участки обнаруживаются в последовательности ITS. Аналогичная ситуация характерна для D1-D1' петли *Geminocystis herdmanii* PCC6308 (Korelusova et al., 2009).

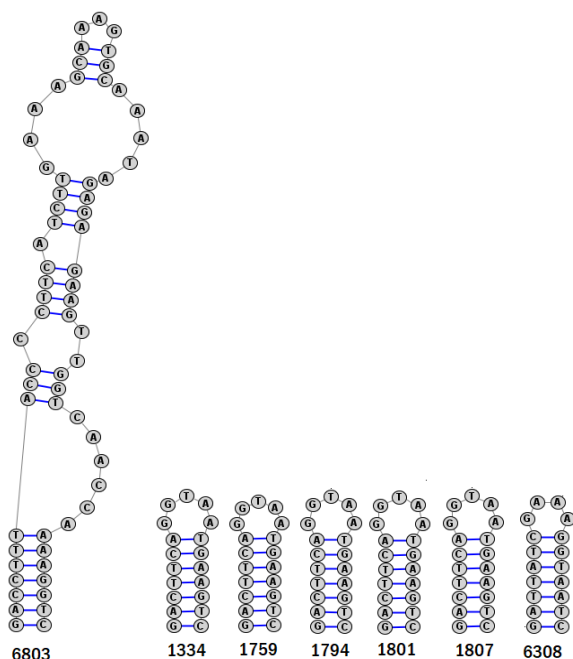


Рисунок 18. Вторичная структура домена D1-D1' штаммов Кластера «geminocystis», а также *Synechocystis sp.* PCC6803 и *Geminocystis herdmanii* PCC6308.

Участок В-бокс идентичен у штаммов CALU1334 и CALU1759 и отличается точечной мутацией 2 нуклеотидов от штаммов CALU1794, CALU1801 и CALU1807, у которых В-бокс также идентичен (рис. 19). По длине и вторичной структуре он отличается от В-бокс штаммов PCC6803 и PCC6308.

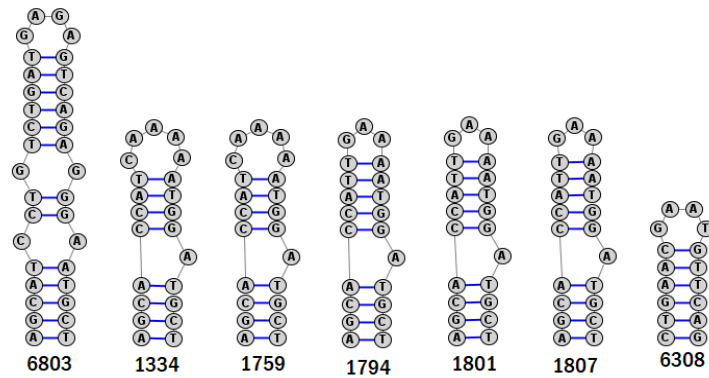


Рисунок 19. Вторичная структура домена B-бок штаммов Кластера «geminocystis», а также *Synechocystis* sp. PCC6803 и *Geminocystis herdmanii* PCC6308.

Домен V3 идентичен у всех штаммов Кластера (рис. 20). Он короче аналогичного участка штамма PCC6308 и очень сильно отличается по длине и вторичной структуре от V3-региона штамма PCC6803.

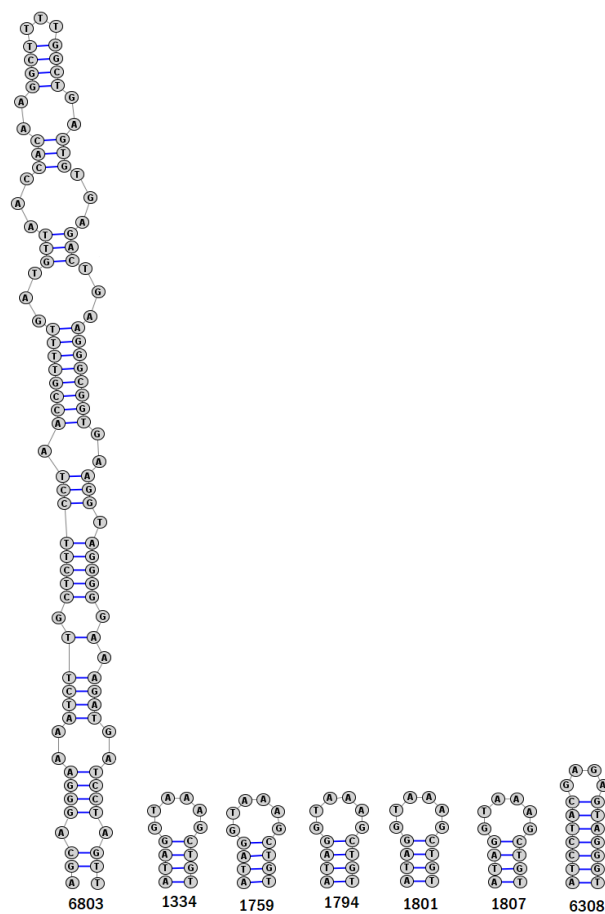


Рисунок 20. Вторичная структура домена V3 штаммов Кластера «geminocystis», а также *Synechocystis* sp. PCC6803 и *Geminocystis herdmanii* PCC6308.

В итоге, 16S-23S ITS штаммов Кластера «geminocystis» отличаются от 16S-23S ITS типового штамма *Synechocystis* sp. PCC6803 по всем исследованным признакам. Наблюдается их некоторое сходство с 16S-23S ITS типового штамма *Geminocystis herdmanii* PCC 6308, однако, варьирование длины маркерных участков и присутствие домена V2 указывает на уникальность наших штаммов и позволяет рассматривать их в ранге отдельного таксона уровня вида.

Выводы

1. По совокупности фенотипических и генотипических признаков штаммы CALU 1077, CALU 1173 и CALU 1127/CALU 1174 из вновь обособленного филогенетического кластера “biofilms” могут быть описаны как представители трех видов нового рода одноклеточных цианобактерий.
2. По совокупности фенотипических и генотипических признаков штаммы CALU 1334, CALU 1759, CALU 1794, CALU 1801 и CALU 1807 из вновь обособленного филогенетического кластера “geminocystis” могут быть описаны как представители отдельного вида ботанического рода *Geminocystis*.

Список литературы

1. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР: выпуск 2, Синезеленые водоросли // Москва: Гос. изд-во «Советская наука». 1953. 652 с.
2. Громов Б.В., Титова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Л.: ЛГУ. 1983. С. 3-27
3. Дедю И.И. Экологический энциклопедический словарь // Гл.ред. Молдавской советской энциклопедии. Кишинев. 1989. 406 с.
4. Карапетян М. А. Полифазный подход в систематике рода *Synechocystis*: Выпускная квалификационная работа магистра (магистерская диссертация) // Санкт-Петербург. 2017. 54с.
5. Максимович Н.В. Статистическое сравнение кривых роста // Вестник ЛГУ. 1989. Сер. 3. Вып. 4 (№ 24).
6. Пиневиц А. В. Микробиология. Биология прокариотов: Учебник. В 3 т. Том 1//СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2006. 352 с.
7. Пиневиц А.В., Аверина С.Г. Кислородная фототрофия // СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та. 2002. 231 с.
8. Пиневиц А.В., Аверина С.Г., Величко Н.В. Очерки биологии прохлорофитов // СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та. 2010. 198 с.
9. Хлебович В. В. Критическая соленость биологических процессов // Ленинград. Издательство «Наука». 1974. 199 с.
10. Хлебович В.В. Экология особи (очерки фенотипических адаптаций животных) // Санкт-Петербург. 2012. 143 с.
11. Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D. Basic local alignment search tool // Journal of Molecular Biology. 1990. V. 215. P. 403–410.
12. Boyer S. L., Flechtner V. R., Johansen J. R. Is the 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria // Molecular Biology and Evolution. 2001. V. 18. P. 1057–1069
13. Callieri C., Coci M., Corno G., Macek M., Modenutti B., Balseiro E., Bertoni R. Phylogenetic diversity of nonmarine picocyanobacteria // FEMS Microbiology Ecology. 2013. V. 85 P. 293–301.
14. Castenholz R. W. Phylum BX. Cyanobacteria // Boone D.R., Castenholz R.W., Garrity G. M. (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd Ed.). Springer-Verlag. New York. 2001. V. 1. P. 473–599.

15. Chenna R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T. J., Higgins D. G., Thompson J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs // *Nucleic Acids Research*. 2003. Vol. 31. P. 3497–3500
16. Choi G.-G., Ahn C.-Y., Oh H.-M. Phylogenetic relationships of *Arthrospira* strains inferred from 16S rRNA gene and *cpcBA*-IGS sequences // *Algae*. 2012. V. 27. P. 75-82.
17. Cohn F.J. Neue Untersuchungen über Bakterien // *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*. 1875. V. 1. P. 141-207.
18. Duxbury Z., Schliep M., Ritchie R.J., Larkum A.W., Chen M. Chromatic photoacclimation extends utilisable photosynthetically active radiation in the chlorophyll d-containing cyanobacterium, *Acaryochloris marina* // *Photosynth Res*. 2009. V. 101. P.69-75.
19. Dvořák P., Casamatta D.A., Poulíčková A., Hašler P., Ondřej V., Sanges R. *Synechococcus*: 3 billion years of global dominance // *Molecular Ecology*. 2014. V. 23. No. 22. P. 5538–5551.
20. Everroad C., Six C., Partensky F., Thomas J.C., Holtzendorff J., Wood A.M. Biochemical bases of type IV chromatic adaptation in marine *Synechococcus* spp. // *Journal of Bacteriology*. 2006 V. 188. P. 56-3345.
21. Fiore M. F., Sant'Anna C. L., Azevedo M. T. de P., Komarek J., Kastovsky J., Sulek J., Lorenzi A. S. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation // *Journal of Phycology*. 2007. V. 43. P. 789–798
22. Gan F., Shen G., Bryant D.A. Occurrence of Far-Red Light Photoacclimation (FaRLiP) in diverse cyanobacteria // *Life*. 2014. V. 5. P. 4-24.
23. Geitler L. *Cyanophyceae von Europa* // L. Rabenhorst's *Kryptogamen-Flora von Deutschland, Oesterrich und der Schweiz* (2. Auflage). Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft m.b.h. 1932. Bd. 14. P. 1196.
24. Glowacka J., Szeffel-Markowska M., Waleron M., Łojkowska E., Waleron K. Detection and identification of potentially toxic cyanobacteria in Polish water bodies // *Acta Biochim Pol*. 2011. V. 58. P. 321-33.
25. Guttel R., Larsen N., Woese C. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. // *Microbiological review*. 1994. V. 8. P. 10-24.
26. Hauer T. & Komárek J. *CyanoDB.cz 2.0 - On-line database of cyanobacterial genera* // Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR, 2019. <http://www.cyanodb.cz>
27. Hirose Y., Chihong S., Watanabe M., Yonekawa C., Murata K., Ikeuchi M., Eki T. Diverse chromatic acclimation processes regulating phycoerythrocyanin and rod-shaped phycobilisome in cyanobacteria // *Molecular Plant*. 2019. V. 12. P. 715-725.

28. Hirose Y., Katayama M., Ohtsubo Y., et al. Complete genome sequence of cyanobacterium *Geminocystis* sp. strain NIES-3708, which performs Type II Complementary Chromatic Acclimation // *Genome announcements*. 2015. V. 3. e00357-15. doi:10.1128/genomeA.00357-15.
29. Johansen J. R., Casamatta D. A. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm // *Algological Studies*. 2005. V. 117 P. 71-93.
30. Johansen J. R., Kovacik L., Casamatta D. A., Fucikova K., Kastovsky J. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria) // *Nova Hedwigia*. 2011. V. 92. P. 283–302.
31. Kaneko T., Sato S., Kotani H. et al. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions // *DNA Research*. 1996. V.3. P. 109-136.
32. Kaneko T., Tanaka A., Sato S. et al. Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence Features in the 1 Mb Region from Map Positions 64% to 92% of the Genome // *DNA Research*. 1995.
33. Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Toward a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014. V. 64. P. 51-346.
34. Kinne O. Salinity – Invertebrates // *Marine Biology*. 1. Pt. 2. Viley-Interscience. 1971. P. 683–995.
35. Komárek J. & Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 2. Teil: *Oscillatoriales* // In: Büdel B., Krienitz L., Gärtner G. & Schagerl M. (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa. Elsevier/Spektrum, Heidelberg. 2005. V.19/2. 759 p.
36. Komárek J., Anagnostidis K. Cyanoprokaryota 1. Teil: *Chroococcales* // In: Ettl H., Gärtner G., Heynig H., Mollenhauer D. (eds), Süßwasserflora von Mitteleuropa. Gustav Fischer. Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm. 1998. V. 19/2. 548 p.
37. Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J. R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach // *Preslia*. 2014. V. 86. P. 295–335.
38. Korelusova J., Kastovsky J., Komarek J. Heterogeneity of the cyanobacterial genus *Synechocystis* and description of a new genus, *Geminocystis* // *J. Phycol.* 2009. V. 45. P. 928–937.

39. Kützing F.T. *Phycologia generalis: oder Anatomie, Physiologie und Systematik der Tange* // Leipzig: F. A. Brockhaus. 1843. P. 173.
40. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (Eds. Stackebrandt E., Goodfellow M.) // New York: John Wiley and Sons. 1991. P. 115–175.
41. MacColl R. Cyanobacterial phycobilisomes // *Journal of structural biology*. 1998. V. 124. P. 311–334.
42. Mares J., Johansen J. R., Hauer T. et al. Taxonomic resolution of the genus *Cyanothece* (Chroococcales, Cyanobacteria), with a treatment on *Gloeothece* and three new genera, *Crocospaera*, *Rippkaea*, and *Zehria* // *J. Phycol.* 2019. DOI: 10.1111/jpy.12853.
43. Margheri M. C., Bosco M., Giovannetti L., Ventura S. Assessment of the genetic diversity of halotolerant coccoid cyanobacteria using amplified 16S rDNA restriction analysis // *FEMS Microbiology Letters*. 1999. V. 173. P. 9-16.
44. Mathews D.H., Schroeder S.J., Turner D.H., Zuker M. Predicting RNA secondary structure // *The RNA world*, third edition (ed. Gesteland R.F., Cech T.R., Atkins J.F.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2005. P. 631–657.
45. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucleic Acids Research*. 1980. V. 8. P. 5-4321.
46. Nägeli C.W. von. *Gattungen einzelliger Algen, physiologisch und systematisch bearbeitet* // Zürich: Friedrich Schulthess. 1849. V. 10. P. 45, 56.
47. Oren A., Garrity G. M. Proposal to change General Consideration 5 and Principle 2 of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014. V. 64 P. 309-310.
48. Parks D. H., Chuvochina M., Waite D. W., Rinke C., Skarszewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. A proposal for a standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny // *bioRxiv* 256800 preprint. 2018. doi: <https://doi.org/10.1101/256800>.
49. Pinevich A. V. Proposal to consistently apply the International Code of Nomenclature of Prokaryotes (ICNP) to names of the oxygenic photosynthetic bacteria (cyanobacteria), including those validly published under the International Code of Botanical Nomenclature (ICBN)/International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (ICN), and proposal to change Principle 2 of the ICNP // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015. V. 65. P. 1070-1074.
50. Pinevich A., Matthijs H., Garcia-Mendoza E., Bazanova A. The uncommon pigment composition of, and complementary chromatic adaptation in marine *Synechocystis* sp. // *Algological studies*. 2000. V. 99. P. 67-77.

51. Radka Muhlsteinova, Jeffrey R. Johansen, Nicole Pietrasiak et al. Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus* // *Phytotaxa*. 2014. V. 163. P. 241-261.
52. Rippka R. Isolation and purification of cyanobacteria // *Methods in Enzymology*. 1988. V. 167. P. 3-27.
53. Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M., Stanier R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. // *J. Gen. Microbiol.* 1979. V. 111. P. 1-61.
54. Rippka R., Waterbury J. B., Stanier R. Y. Isolation and purification of cyanobacteria: some general principles // In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, chapter 8. 1981. P. 212-220.
55. Sachs J. *Lehrbuch der Botanik* // Leipzig, W. Engelmann. 1874. 492 p.
56. Saitou N.M., Nei M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 24. No. 4. P. 189-204.
57. Schleifer K-H. Phylum XIII. Firmicutes // Vos P. De, Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.-H. and Whitman W. B. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd Ed.). Springer-Verlag. New York. 2009. V. 3. P. 19-1317.
58. Singh P., Singh S.S., Aboal M., Mishra A.K. Decoding cyanobacterial phylogeny and molecular evolution using an evonumeric approach // *Protoplasma*. 2015. V. 252. P. 519-535.
59. Stanier R. Y., Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria // *Annual Review of Microbiology*. 1977. V. 31. P. 74-225.
60. Stanier R. Y., Siström W. R., Hansen T. A. et al. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria // *International journal of systematic bacteriology*. 1978. V. 28 P. 335-336.
61. Stanier R. Y., van Niel C.B. The Concept of a Bacterium // *Archiv für Mikrobiologie*. 1962. V. 42. P. 17-35.
62. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // *Molecular Biology and Evolution*. 1993. V. 10. P. 512-526.
63. Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 2004. V. 101. P. 11030-11035.

64. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Molecular Biology and Evolution*. 2011. V. 28. P. 2731-2739.
65. Tandeau de Marsac N. Occurrence and nature of chromatic adaptation in cyanobacteria. // *Journal of Bacteriology*. 1977. V. 130. P. 82-91.
66. Turner S., Pryer K. M., Miao V. P. W. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis // *J. Eukaryotic Microbiol.* 1999. V. 46. P. 327–338.
67. Waterbury J. B., Stanier R. Y. Isolation and growth of cyanobacteria from marine and hypersaline environments // In: Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., Schlegel, H.G. (eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, chapter 9. 1981. P. 221-223.
68. Zuker M. M fold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31. P. 3406–3415.
69. Выделение геномной ДНК из цианобактерий [Электронный ресурс] // MOLBIO.RU. Режим доступа: http://molbiol.ru/protocol/24_01.html#a2.
70. Коллекция цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей (Collection of Algae of Leningrad University, CALU) [Электронный ресурс] // Санкт-Петербургский государственный университет, Научный парк. Режим доступа: <http://researchpark.spbu.ru/collection-ccem-rus/1628-ccem-kollekciya-calu-rus>.
71. Pasteur Culture collection of Cyanobacteria [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://webext.pasteur.fr/cyanobacteria/>.

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность моему нынешнему научному руководителю, Аверине Светлане Геннадиевне, за помощь, постоянное руководство и безграничное терпение.

Хочу поблагодарить моего первого научного руководителя, Гаврилову Ольгу Владимировну, за постановку цели и поддержку на первых этапах, а также за предоставление электронных микрофотографий для выполнения данной работы.

Выражаю благодарность Рычковой Тамаре Николаевне за помощь в проведении световой микроскопии и предоставление материалов.

Приложение 1

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1077 (длина последовательности - 1380 н.).

AGCTTACACATGCAGTCGAACGGAACTCTTCGGAGTTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GAGAACTGCCCCTTGGACAGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAAAACCTGATGTGCCGAA
AGGTGAAATATTTATAGCCAAGGGATGTGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTTGGGTAAAGGC
CGACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGA
GCAATACCGCGTGAGGGAAGAAGGCTCTTGGGTCGTAAACCTCTTTTGTTTGGGAAGAAACCTG
ACGGTACCAAACGAATAAGCCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGAGG
CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTGTGCAAGTCTGTTGTCAA
AGCGCGAGGCTCAACCTTGTATAGGCAATGGAAACTGTGCGACTAGAGTGCGGTAGGGGTAGA
GGGAATTCCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGC
TCTACTGGCCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTATTAGATAC
CCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCCGTGCAGTGCCG
TAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CAGGGTTTGACATGTCATGAATCAAGGGGAAACCTTTGAGTGCCTTCGGGAGCATGAACACAG
GTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCACGTAGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCTAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTACTIONACAAT
GCTACGGACAAAGGGTTGCTAGCCTGCGAAGGTATGCTAATCTCATAAACCCTGGCACAGTTC
AGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATAAC
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCCACGCC
CGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGCGCCGAAGTCTGTCAGT

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1127 (длина последовательности – 1368 н.).

CAGTGCCAGCTTACACATGCAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACGGGTGAG
TAACGCGTGAGAACTGCCCCTTGGACAGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAAAACCTGAT
GTGCCGAAAGGTGAAATATTTATAGCCAAGGGGATGTGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTTAG
GTAAAGGCTGACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGGGCAACC
CTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCTTTTGGGTCGTAAACCTCTTTTGTTTGGGAA
GAAACCTGACGGTACCAAACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGAC
GGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTTTACAAGTCT
GTTGTCAAAGCGCGAGGCTCAACCTTGTATAGGCGATGGAAACTGTAAGACTAGAGTTCGGTA
GGGGTAGAGGGAATTCCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGCTCTACTGGGCTGAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGAT
TAGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCCGTGC
AGTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAGGGTTTGACATGTCATGAATCCTTTGGAAACAGAGGAGTGCCTTCGGGAGCATGA
ACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCACGTAGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCTAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTA
CTACAATGCTACGGACAAAGGGTTGCTAGCCTGCGAAGGTATGCTAATCTCATAAACCCTGGC
ACAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTC

AGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGG
CCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGA

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1173 (длина последовательности – 1389 н.).

CCTAGCGGAGCTTACACATGCAGTCGAACGGAACCCTTCGGGGTTTAGTGGCGGACGGGTGAG
TAACGCGTGAGAACTGCCCTTGGACAGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAAAACCTGAT
GTGCCGAAAGGTGAAATATTTATAGCCAGGGGATGTGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGT
GTAAGGGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGC
CTGACGGAGCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCTTTTGGGTCGTAAACCTCTTTTGTTTGGGAA
GAAACCTGACGGTACCAAACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGAC
GGAGGATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTTTTCAAGTCT
GTTGTCAAAGCGCGAGGCTCAACCTTGTATAGGCGATGGAACTGAAAGACTAGAGTGCGGTA
GGGGTAGAGGGAATTTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGC
GAAGGCGCTCTACTGGGCCTGCACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATT
AGATACCCCTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCCGTGCA
GTGCCGTAGCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCCAA
GGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAA
CCTTACCAGGGTTTGACATGTCGCGAATTTCCGGGGAACTCGAAAGTGCCTTCCGGGAGCGCGA
ACACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCACGTAGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCTAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTA
CTACAATGCTACGGACAAAGGGTTGCTAGCCTGCGAAGGTATGCTAATCTCATAAACCGTGGC
ACAGTTCAGATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTC
AGCATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGG
CCACGCCCGAAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGCGCCGAAGTCTGGACCTGG

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1174 (длина последовательности – 1377 н.).

TGCTTACACATGCAGTCGAACGGAGTACTTCGGTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GAGAACTGCCCTTGGACAGGGACAACAGCTGGAAACGGCTGCTAAAACCTGATGTGCCGAA
AGGTGAAATATTTATAGCCAGGGGATGTGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTTAGGTAAAGGC
TGACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGGGCAACCCTGACGGA
GCAATACCGCGTGAGGGACGAAGGCTTTTGGGTCGTAAACCTCTTTTGTTTGGGAAGAAACCTG
ACGGTACCAAACGAATAACCATCGGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAGGATG
CAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCCGCAGGTGGTTTTACAAGTCTGTTGTCAA
AGCGCGAGGCTCAACCTTGTATAGGCGATGGAACTGTAGGACTAGAGTTCGGTAGGGGTAGA
GGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGC
TCTACTGGGCCTGAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTAGGGGAGCGAAAGGGATTAGATACCC
CTGTAGTCCTAGCCGTAACGATGGACACTAGGTGTTGCGCGTATCGACCCGTGCAAGTGCCTGTA
GCTAACGCGTTAAGTGTCCCGCTGGGGAGTACGCTCGCAAGAGTGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGGTTTGACATGTCATGAATCCTTTGGAAACAGAGGAGTGCCCTCGGGAGCATGAACACAGGT
GGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CACGTAGTTAGTTGCCATCATTAGTTGGGCACTCTAGCTAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGTGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTAATAATGC
TACGGACAAAGGGTTGCTAGCCTGCGAAGGTATGCTAATCTCATAAACCGTGGCACAGTTCAG

ATCGTAGGCTGCAACTCGCCTACGTGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGCCACGCCCC
AAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGCGCCGAACGTATGACA

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1334 (длина последовательности – 1366 н.).

GCCTACACATGCAGTCGACGGTCTTTTTAAGATAGTGGCGGACGGGTGAGGAACACGTGAGAA
TCTGCCTTTAGGTTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCTGAGAAGTA
AAAGATTTATTGCCTAAAGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTAC
CATGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAA
TACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCAAACTTAGGGAAGAAGAAAGTGA
CGGTACCTAATATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAA
GCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGCATTAAAGTCTGCTGTCAAAGA
CCGAAGCTCAACTTCGGGCAGGCGGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGTATAGTAGGGGTAGAGG
GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTC
TACTGGGCATATACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGTATTAGATACCCCT
GTAGTCCTAGCGGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGTCTGTATCGACCCAGACTGTGCCGAAGC
AAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAG
GCTTGACATCCTGCGAATTTTGGGGAAACTCAGAAGTGCCTTAGGGAACGCAGAGACAGGTGG
TGCATGGCTGTTCGTACGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
CGTCCCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGGGAGAACTCGGAGGA
AGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGGT
TGAGACAAAGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCGAATCCCAGCAAACCTCAGCCCCAGTTCA
GATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGTAGTAATCGCAGGTCAGCATACT
GCGGTGAATCCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCC
GAAGTCGTTACTCCAACCTGTA AAAAAGAGGAGGATGCCGAA

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1759 (длина последовательности – 1369 н.).

AGCTACACATGCAGTCGAACGGTCTTTTTAAGATAGTGGCGGACGGGTGAGGAACACGTGAGA
ATCTGCCTTTAGGTTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCTGAGAAGT
AAAAGATTTATTGCCTAAAGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCATGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCA
ATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCAAACTTAGGGAAGAAGAAAGTG
ACGGTACCTAATATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCA
AGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGCATTAAAGTCTGCTGTCAAAG
ACCGAAGCTCAACTTCGGGCAGGCGGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGTATAGTAGGGGTAGAG
GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACCCCAGTGGCGAAGGCGCT
CTACTGGGCATATACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCC
TGTAGTCCTAGCGGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGTCTGTATCGACCCAGACTGTGCCGAAG
CAAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAA
GGCTTGACATCCTGCGAATTTTGGGGAAACTCAGAAGTGCCTTAGGGAACGCAGAGACAGGTG
GTGCATGGCTGTTCGTACGCTCGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TCGTCCCTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGGGAGAACTCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAATGG

TTGAGACAAAGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCGAATCCCAGCAAACCTCAGCCCCAGTTCA
GATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACT
GCGGTGAATCCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCC
GAAGTCGTTACTCCAACCTGTA AAAAAGAGGAGGATGCCGAAGT

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1794 (длина последовательности – 1374 н.).

GCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTCTTTTTAAGATAGTGGCGGACGGGTGAGGAACACGTGA
GAATCTGCCTTTAGGTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCTGAGAA
GTAAAAGATTTATTGCCTAAAGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCC
TACCATGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAG
CAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGAAAACCTCAAACTTAGGGAAGAAGAAA
GTGACGGTACCTAATATTAGCATCGGCTATCTCCGTGCTAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATG
CAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGCATTAAAGTCTGCTGTCAA
AGACCGAAGCTCAACTTCGGGCAGGCGGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGTATAGTAGGGGTAG
AGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCG
CTCTACTGGGCATATACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACC
CCTGTAGTCCTAGCGGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGTCTGTATCGACCCAGACTGTGCCGA
AGCAAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
AAGGCTTGACATCCTGCGAATTTTGGGGAAACTCAGAAGTGCCTTAGGGAACGCAGAGACAGG
TgGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGGGAGAACTCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACAAT
GGTTGAGACAAAGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCGAATCCCAGCAAACCTCAGCCCCAGT
TCAGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCAT
ACTGCGGTGAATCCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACG
CCCGAAGTCGTTACTCCAACCTGTA AAAAAGAGGAGGATGCCGAAGTGAC

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1801 (длина последовательности – 1373 н.).

CGCAGCTACACATGCAGTCGAACGGTCTTTTTAAGATAGTGGCGGACGGGTGAGGAACACGTG
AGAATCTGCCTTTAGGTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCTGAGA
AGTAAAAGATTTATTGCCTAAAGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGC
CTACCATGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACAC
GGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGA
GCAATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTA AACCTCAAACTTAGGGAAGAAGAAA
GTGACGGTACCTAATATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGAT
GCAAGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGCATTAAAGTCTGCTGTCA
GAGACCGAAGCTCAACTTCGGGCAGGCGCTGTAAACTGACAAGCTAGAGTATAGCAGGGGTAG
AGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGTAGGCG
CTCTACTGGTGCATATACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGGTAGCAGAGGCATTAGATAC
CCCTGTAGTCCTAGCCGCAAACGATGGATACTAGGTGTAGTCTGTATCGACCCAGACTGTGCCG
AAGCAAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATT
GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAT
CAAGGCTTGACATCCTGCGAATTTTGGGGAAACTCAGAAGTGCCTTAGGGAACGCAGAGACAG
GTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCGCCGGGGAGAACTCGG

AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTA CTACA
ATGGTTGAGACAAAGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCGAATCCCAGCAAAATCAGCCCCA
GTTTCAGATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGC
ATACTGCGGTGAATCCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCA
CGCCCGAAGTCGTTACTCCA ACTGTAAAAAGAGGAGGATGCCGAAGT

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК штамма CALU 1807 (длина последовательности – 1368 н.).

CGTGCTACACATGCAGTCGACGGTCTTTTTAGATAGTGGCGGACGGGTGAGGAACACGTGAGA
ATCTGCCTTTAGGTTCGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGGATGAGCTGAGAAGT
AAAAGATTTATTGCCTAAAGAGGAGCTCGCGTCTGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTA
CCATGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGAGCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGGGGGGAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCA
ATACCGCGTGAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCAAACTTAGGGGAAGAAGAAAGTG
ACGGTACCTAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCA
AGCGTTATCCGGAATCATTGGGCGTAAAGAGTCTGTAGGTGGCATTAAAGTCTGCTGTCAAAG
ACCGAAGCTCAACTTCGGGCAGGCGGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGTATAGTAGGGGTAGAG
GGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGCT
CTACTGGGCATATACTGACACTGAGAGACGAAAGCTAGGGTAGCGAAAGGGATTAGATACCCC
TGTAGTCCTAGCGGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGTCTGTATCGACCCAGACTGTGCCGAAG
CAAACGCGTTAAGTATCCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAA
GGCTTGACATCCTGCGAATTTTGGGGAAACTCAGAAGTGCCTTAGGGAACGCAGAGACAGGTG
GTGCATGGCTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC
TCGTCCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAGGGAGACCCGCCGGGAGAACTCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTA CTACAATGG
TTGAGACAAAGGGAAGCGAAGCCGCGAGGTGAAGCGAATCCCAGCAAACTCAGCCCCAGTTCA
GATTGCAGGCTGAAACTCGCCTGCATGAAGGAGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACT
GCGGTGAATCCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCA CGCCC
GAAGTCGTTACTCCA ACTGTAAAAAGAGGAGGATGCCGAAG

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1077 (длина последовательности – 700 н.).

CGAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTCAC
ACTCATCTAGACCGAACCAATCAGAATTAAGTCAGATGAGAGTCATCCCAAGGTCGTTGAGGT
ATAGAAAAAATTTCAGACGAATCTTTCAA ACTATTA ACTAGGTGAAGGACATGGGCTATTAGCTC
AGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCGAGTCCAGGATGGCCCACTT
GCCACCTATCGCCATCTTAATGGCTAAGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTG
CAAGCAGGATGTCAACGGTTCGAGTCCGTTAACCTCCACCAATTAAGTTTGCTTTATCATCCAT
CACC AAACGCTATTGGCACACAGCACCTCGATATGTTTTGACAGTTATTA AAAACTAGTCAACAC
GCATATGAGTCTGCTGGGTTCCGCCAGCGAGAACCTTGAAA ACTGCATATGAGCAAGAAATTG
CTAGGTAGAATCAATTATCTGCGAGTGAGTAACGCGTAGATAATAACGATTCACAGACACCAA
AAAATCAAAGAACAAATTGGTCAAGCTACAAAGGGCTTATGGTGGATACCTAGGCACACAGAG
A

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1127 (длина последовательности – 670 н.).

CGAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTCAC
ACTCATCTAGACCGAACCAATCAGTATTAAGTCAGATGAGAGTCATCCCAAGGTCGTTGAGGTA
TGTCAAAAAATTCATCTCAGGAATCTTTCAAACCTATTAAGTGGTGGAGGGAAATGGGCTATTA
GCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGGTTCGAGTCCAGGATGGCC
CACTTAGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTCTGA
GTCCGCTAACCTCCACCAATTTCACTTACCAAATTTTCACTACGGCACACAGCACCTTACTATGT
TTTGAATAAATAAGGTAGTCAAAGTACATAAGAGAATGCTGGGTTCAGCCCAGCGAGAA
CCTTGAACACTGCGTATGAGCAAGAAATTGCTAGGTAGAATCAATTAATGATGAGTGAGTAAC
GCATCATTAATAACGATTCACAGACACCAAAGAATCAAAAGAAACAAATTGGTCAAGCTACAA
AGGGCTTATGGTGGATACCTAGGCACACAGAGAA

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1173 (длина последовательности – 664 н.).

CGAGTCGTTACTCTAACCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTCAC
ACTCATCTAGACCGAAACAATTTGGAATAAGTCAGATGAGAGTCATCCCAAGGTCGTTGAGGT
ATGTTAAAGAAATTCCTCGAAAAATCTTTCAAACCTATTAAGTGGTGGAGGGAAATGGGCTATTA
GCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCC
CACTTAGGGGGTTTAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTCTGA
GTCCGCTAACCTCCACCAATTTCCATTGTCACCAATTAAGCTATTGGCACACAGCACCTAATGA
TGTCTTCCCTCTTTAATTTAGAGGTGACGTATTAGACTGCTGGGTTCGCCCAGCGAGAACCTTG
AAAACACTGCATATGAGCAAGAAATTGCTAGGTAGAATCAATTATTTACGAGTGAGTAACGCGTA
GATAATAACGATTCACAGACACCAAAGAAACAAAGAAACAAATTGGTCAAGCTACAAAGG
GCTTATGGTGGATACCTAGGCACACAGAG

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1174 (длина последовательности – 654 н.).

CCGTTCGCGGAGGAGGGCGCCGAAGGCAGGGCTGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
GCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTTTAGGGAGACCTCACACTCATCTAGACCGA
ACCAATCAGTATTAAGTCAGATGAGAGTCATCCCAAGGTCGTTGAGGTATGTTAAGAAAATTC
ATCTCAGTAATCTTTCAAACCTATTAAGTGGTGGAGGGAAATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAG
AGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTTCGAGTCCAGGATGGCCACTTAGGGGGTTTA
GCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTAACCTCCA
CCAATTTCACTTACCAAATTTTCACTACGGCACACAGCACCTTACTATGTTTTGACTATTAACCTA
ATAGGTAGTCAAAGTACATAAGAGAATGCTGGGTTCAGCCCAGCGAGAACCTTGAACACTGCAT
ATGAGCAAGAAATTGCTAGGTAGAATCAATTAATGATGAGTGAGTAACGCATCATTAATAACG
ATTCACAGACACCAAAGAATCAAAAGAAACAAATTGGTCAAGCTACAAAGGGCTTATGGTGG-
ATACCTAGGCACACAGAG

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1334 (длина последовательности – 515 н.).

AGTCGTTACTCCAACCTGTAAAAAGAGGAGGATGCCGAAGGTGGGACTAGTGACTGGGGTGAAG
TCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACTTCAGG
TAATGAAGTCAGCAAGAGTGGAAGAAAATGGCTGGACAACCTATTAAGATTGGGTTTCATGGGC
TATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTCAAGTCCAGGAT
GGCCACTTATTTAAAGTAAAGACTTTAGATAAAAAAAGAGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGA
GCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAGGAACAAATTAGCA

CCATCAAAAATGGATGCTGAACAAATGTTTCAGTAAGAACCTTGAAAACCTGCATAGAAAAAAA
TAGGTAAGCTGTAGAAATCACAGACAGGTCAAGCAAAAAGGGCTGATGGTGGATACCTAGG
CACACAGAG

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1759 (длина последовательности – 480 н.).

AGTCGTTACTCCACTGTAAAAAGAGGAGGATGCCGAAGGTGGGACTAGTGACTGGGGTGAAGT
CGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACTTCAGGT
AATGAAGTCAGCAAGAGTGGAAAGAAAATGGCTGGACAACCTATTAAGATTGGGTTCATGGGCT
ATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTC AAGTCCAGGATG
GCCACTTATTTAAAGTAAAGACTTTAGATAAAAAAAGAGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAG
CGCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAGGAACAAATTAGCAC
CATCAAAAATGGATGCTGAACAAATGTTTCAGTAAGAACCTTGAAAACCTGCATAGAAAAAAAAT
AGGTAAAGCTGTAGAAATCACAGACAGGTCAAGCAAA

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1794 (длина последовательности – 479 н.).

CGAGTCGTTACTCCAACCTGTAAAAAGAGGAGGATGCCGAAGGTGGGACTAGTGACTGGGGTGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACTTCA
GGTAATGAAGTCAGCAAGAGTGGAAAGAAAATGGCTGGACAACCTATTAAGATTGGGTTCATGG
GCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTC AAGTCCAGG
ATGGCCCACTTATTTAAAGTAAAGACTTTAGATAAAAAAAGAGGGGGTATAGCTCAGTTGGTA
GAGCGCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAGGAACAAATTAG
CACCATTGAAAATGGATGCTGAACAAATGTTTCAGTAAGAACCTTGAAAACCTGCATAGAAAAAA
AATAGGTAAAGCTGTAGAAATCACAGACAGTCAGCAA

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1801 (длина последовательности – 532 н.).

GGAAGTTGTCCAGCCCGAGTCGTTACTCCAACCTGTAAAAAGAGGAGGATGCCGAAGGTGGGAC
TAGTGACGTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCT
TAAAGGGAGACTTCAGGTAATGAAGTCAGCAAGAGTGGAAAGAAAATGGCTGGACAACCTATTA
AGATTGGGTTCATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGAGCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCC
TGGTTC AAGTCCAGGATGGCCCACTTATTTAAAGTAAAGACTTTAGATAAAAAAAGAGGGGGT
ATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGGATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCT
CCAGGAACAAATTAGCACCATTGAAAATGGATGCTGAACAAATGTTTCAGTAAGAACCTTGAAA
ACTGCATAGAAAAAAAATAGGTAAGCTGTAGAAATCACAGACAGGTCAAGCAAAAAGGGC
TGATGGTGGATACCTAGGCACACAGAG

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена 16S рРНК, участка ITS и фрагмента гена 23S рРНК штамма CALU 1807 (длина последовательности – 556 н.).

TGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGAAGTTGGTCACGCCCGAAGTCGTTACTCCAACCTGTAAA
AAGAGGAGGATGCCGAAGGTGGGACTAGTGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAC
CGGAAGGTGTGGCTGGATCACCTCCTTAAAGGGAGACTTCAGGTAATGAAGTCAGCAAGAGTG
GAAAGAAAATGGCTGGACAACCTATTAAGATTGGGTTCATGGGCTATTAGCTCAGGTGGTTAGA
GCGCACCCCTGATAAGGGTGAGGTCCCTGGTTC AAGTCCAGGATGGCCCACTTATTTAAAGTAA

AGACTTTAGATAAAAAAAGAGGGGGTATAGCTCAGTTGGTAGAGCGCCTGCTTTGCAAGCAGG
ATGTCAGCGGTTTCGAGTCCGCTTATCTCCAGGAACAAATTAGCACCATTGAAAATGGATGCTGA
ACAAATGTTTCAGTAAGAACCTTGAAAACCTGCATAGAAAAAAAATAGGTAAAGCTGTAGAAATC
ACAGACAGGTCAAGCAAAAAAGGGCTGATGGTGGATACCTAGGCACACAGA

Приложение 2

Таблица 4. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК анализируемых штаммов кластера «biofilms» с последовательностями базы данных NCBI.

Процент сходства	1077		1127		1173		1174	
	1380 п.н.		1368 п.н.		1389 п.н.		1377 п.н.	
	ident	cover	ident	cover	ident	cover	ident	cover
Uncultured bacterium clone Llo_056	97,76%	96%	97,96%	96%	97,38%	96%	97,60%	96%
Uncultured bacterium clone Llo_053	97,53%	96%	97,89%	96%	97,38%	95%	97,53%	96%
Uncultured bacterium clone AK4DE2_09E	97,45%	99%	98,02%	99%	96,96%	99%	97,67%	99%
Uncultured cyanobacterium clone G1-1_58	96,80%	99%	97,21%	99%	96,82%	99%	96,87%	99%
Uncultured cyanobacterium clone SepB-3	96,45%	99%	96,63%	99%	96,90%	99%	96,37%	99%
Uncultured <i>Oscillatoriales</i> cyanobacterium clone WB_1_3	95,64%	99%	95,41%	98%	94,79%	99%	94,90%	99%
<i>Schizothrix cf. calcicola</i> AM116A	91,81%	99%	92,08%	99%	92,50%	98%	91,85%	99%
<i>Schizothrix cf. calcicola</i> AM57C	91,73%	99%	92,07%	99%	92,57%	98%	91,84%	99%
<i>Oscillatoriales</i> cyanobacterium Es_Yyyy600	91,66%	98%	92,38%	99%	92,28%	99%	92,24%	98%
<i>Oscillatoriales</i> cyanobacterium Es_Yyyy400	91,66%	98%	92,52%	99%	92,28%	99%	92,39%	98%
<i>Oscillatoriales</i> cyanobacterium EcFYyyy300	91,59%	98%	92,45%	99%	92,21%	99%	92,31%	98%
<i>Pseudanabaena</i> sp. Es_Yyy1300	91,51%	98%	92,38%	99%	92,14%	99%	92,24%	98%
<i>Leptolyngbya antarctica</i> ANT.LWA.1	91,57%	95%	92,39%	96%	92,52%	95%	92,17%	95%
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	87,94%	99%	88,55%	99%	88,19%	98%	88,27%	99%
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 6312	90,42%	97%	90,55%	98%	90,86%	98%	90,41%	97%

Таблица 5. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК анализируемых штаммов кластера «*Geminocystis*» с последовательностями базы данных NCBI.

Референсные штаммы	1334		1759		1794		1801		1807	
	1334 п.н.		1369 п.н.		1374 п.н.		1373 п.н.		1345 п.н.	
	ident	cover	ident	cover	ident	cover	ident	cover	ident	cover
Uncultured cyanobacterium clone BK-45-25	99,48%	100%	99,41%	99%	99,19%	99%	98,39%	99%	99,41%	100%
<i>Geminocystis</i> sp. NIES-3708	97,90%	100%	97,44%	99%	97,22%	99%	96,42%	99%	97,91%	99%
<i>Geminocystis</i> sp. PltCNmn3	97,80%	95%	97,80%	99%	97,56%	92%	96,78%	92%	97,80%	94%
Uncultured bacterium clone SINH908	97,05%	96%	96,89%	96%	96,59%	95%	95,76%	95%	97,06%	95%
<i>Geminocystis</i> sp. NIES-3709	97,01%	100%	96,71%	99%	96,49%	99%	95,69%	99%	97,01%	99%
<i>Geminocystis</i> sp. CHAB 6541	96,78%	100%	96,34%	99%	96,12%	99%	95,33%	99%	96,78%	99%
Uncultured <i>Geminocystis</i> sp.	96,72%	91%	96,73%	89%	96,48%	88%	95,75%	88%	96,73%	90%
<i>Synechococcus elongatus</i> ISC 106	96,19%	92%	96,19%	89%	95,95%	89%	-	-	94,72%	97%
<i>Cyanobacterium</i> sp. KSU-AQIQ-3	96,17%	97%	95,95%	97%	95,72%	96%	94,91%	97%	96,18%	97%
<i>Chroococcales</i> cyanobacterium SAG 2410	96,10%	97%	96,10%	95%	95,87%	94%	95,11%	95%	96,10%	97%
<i>Cyanobacterium aponinum</i> KSU-WH-5	95,97%	98%	95,90%	95%	95,67%	95%	94,92%	95%	95,90%	97%
<i>Cyanobacterium aponinum</i> IklSCC30	95,97%	98%	95,90%	95%	95,67%	95%	94,92%	95%	95,90%	97%
<i>Cyanobacterium aponinum</i> strain PCC 10605	95,97%	98%	95,54%	97%	95,32%	97%	94,58%	97%	95,90%	97%
<i>Geminocystis herdmanii</i> PCC 6308	95,88%	100%	95,54%	99%	95,32%	99%	94,59%	99%	95,82%	99%
<i>Cyanobacterium</i> sp. THH	95,59%	100%	95,33%	99%	95,11%	99%	94,38%	99%	95,60%	99%
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	90,14%	98%	89,72%	97%	89,50%	97%	89,00%	97%	90,14%	97%

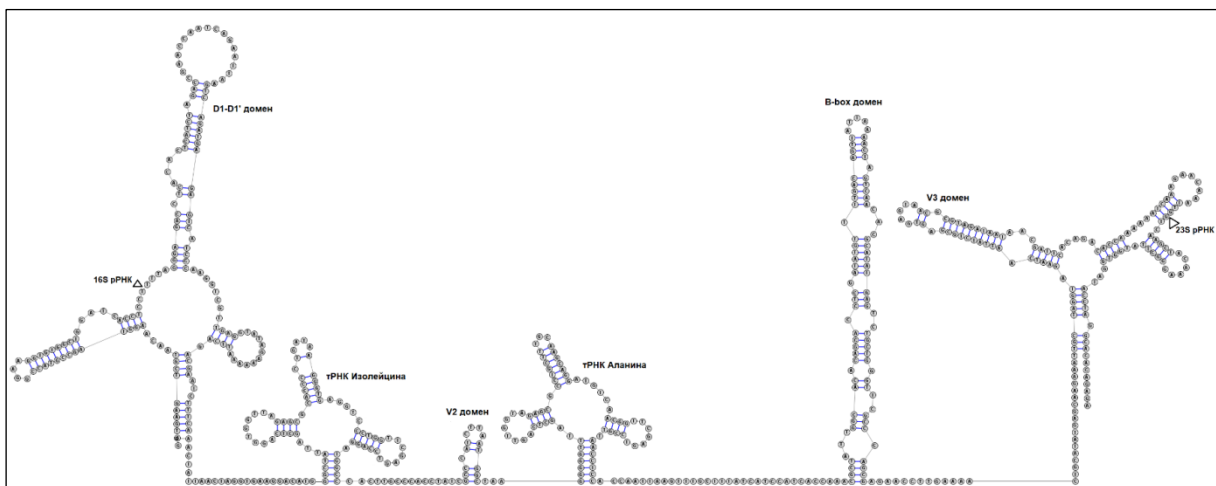


Рисунок 21. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1077

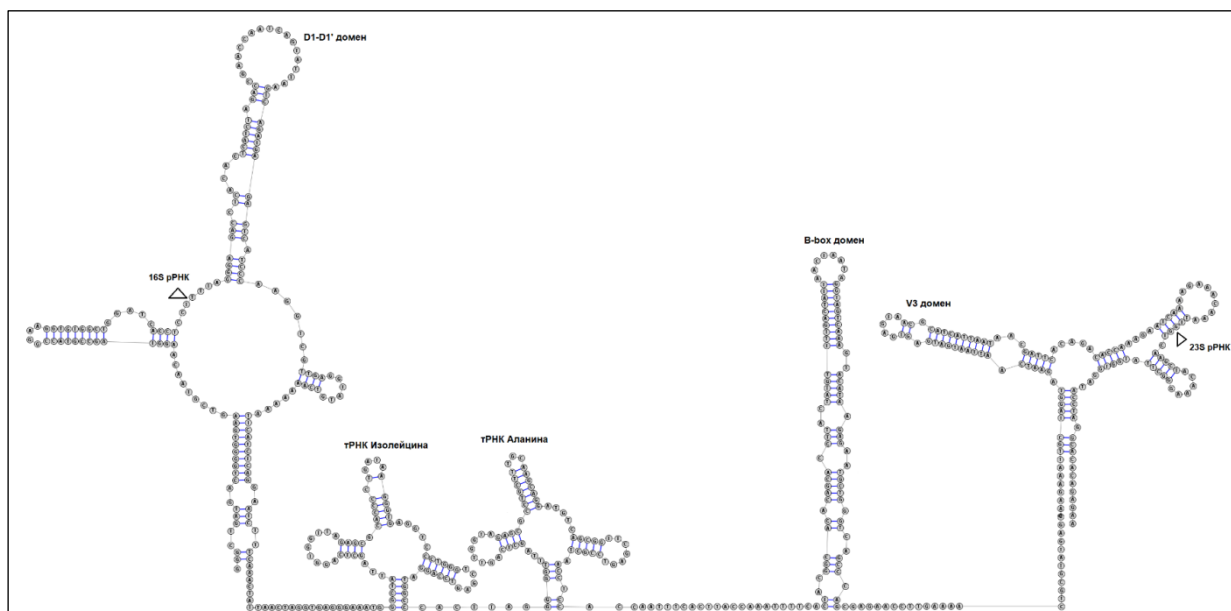


Рисунок 22. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1127

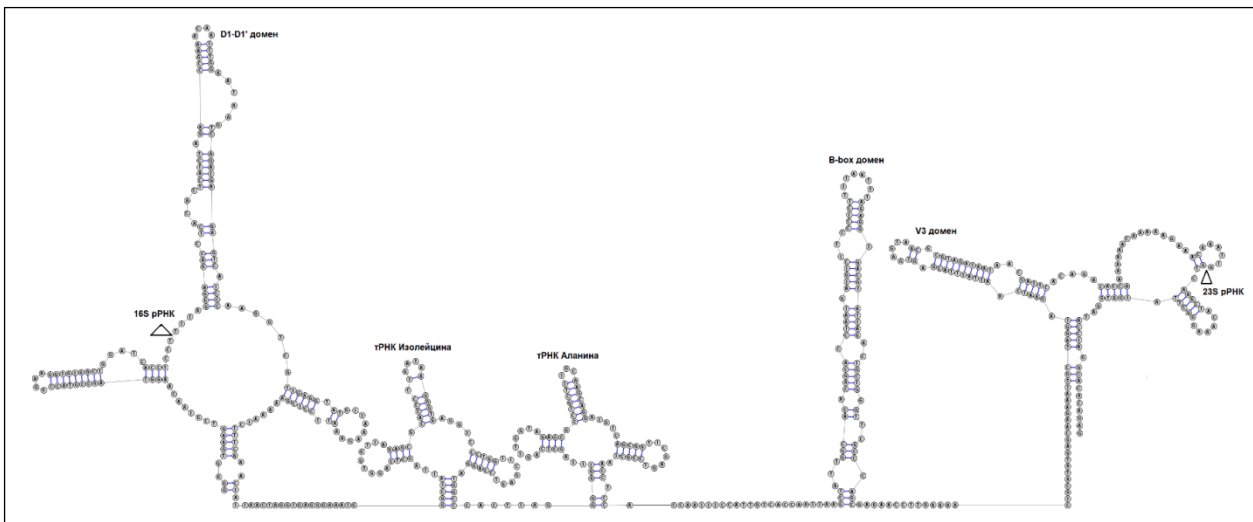


Рисунок 23. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1173

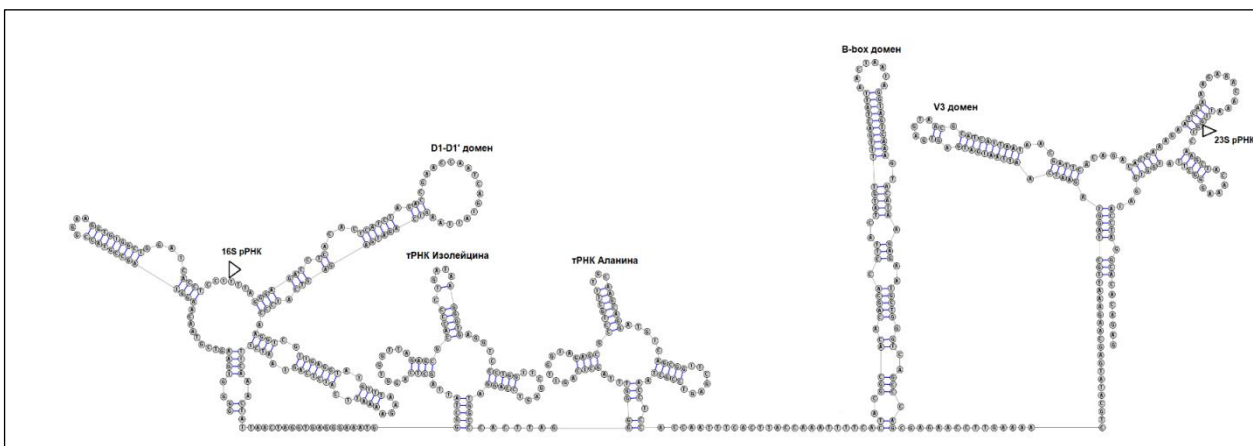


Рисунок 24. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1174

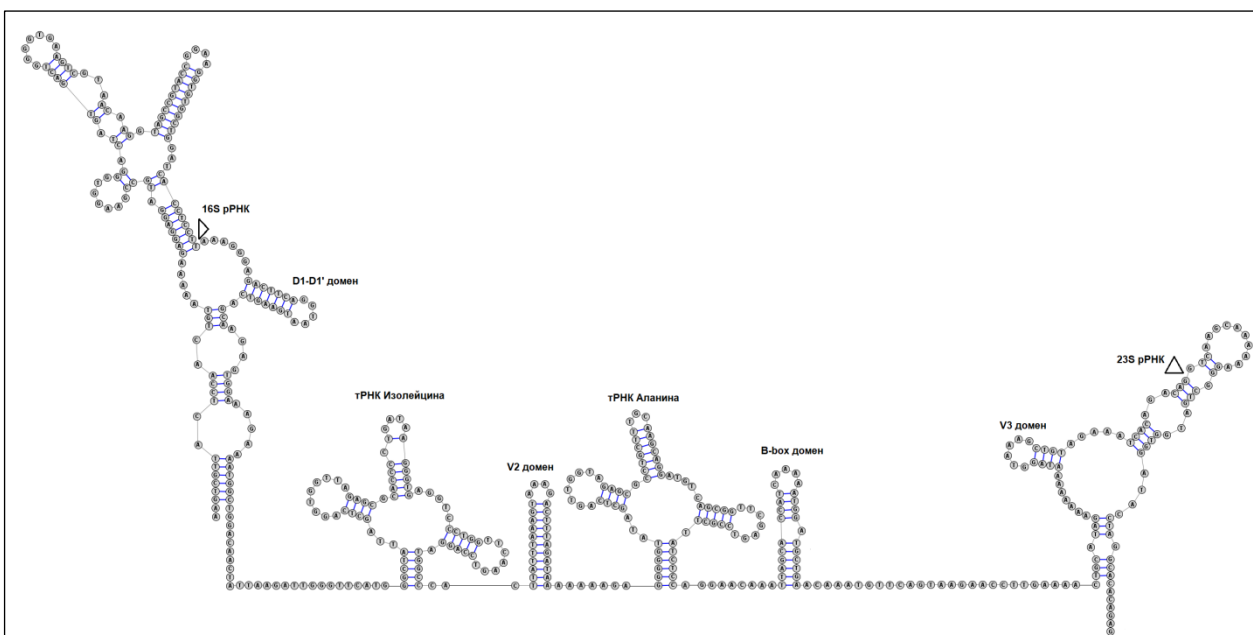


Рисунок 25. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1334

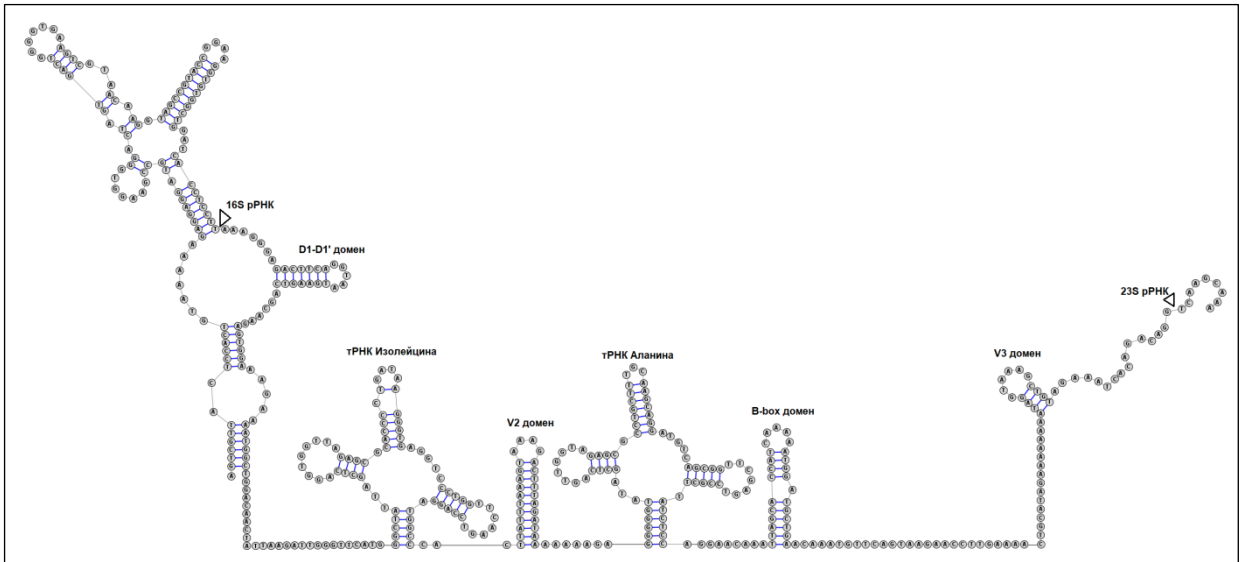


Рисунок 26. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1759

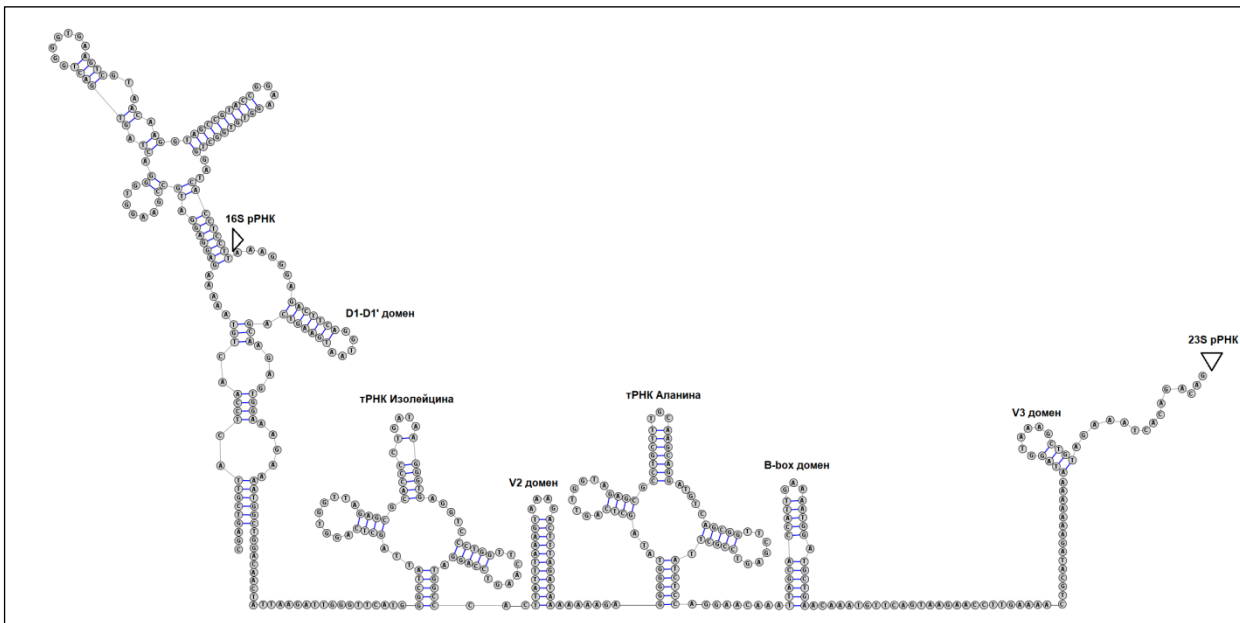


Рисунок 27. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1794

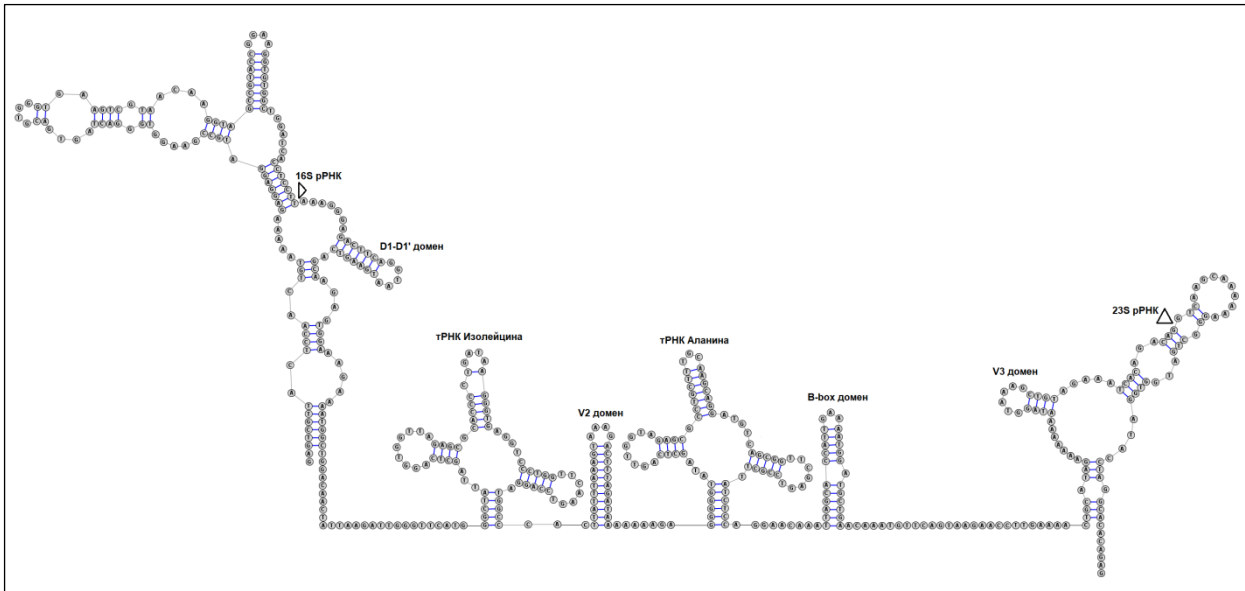


Рисунок 28. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1801

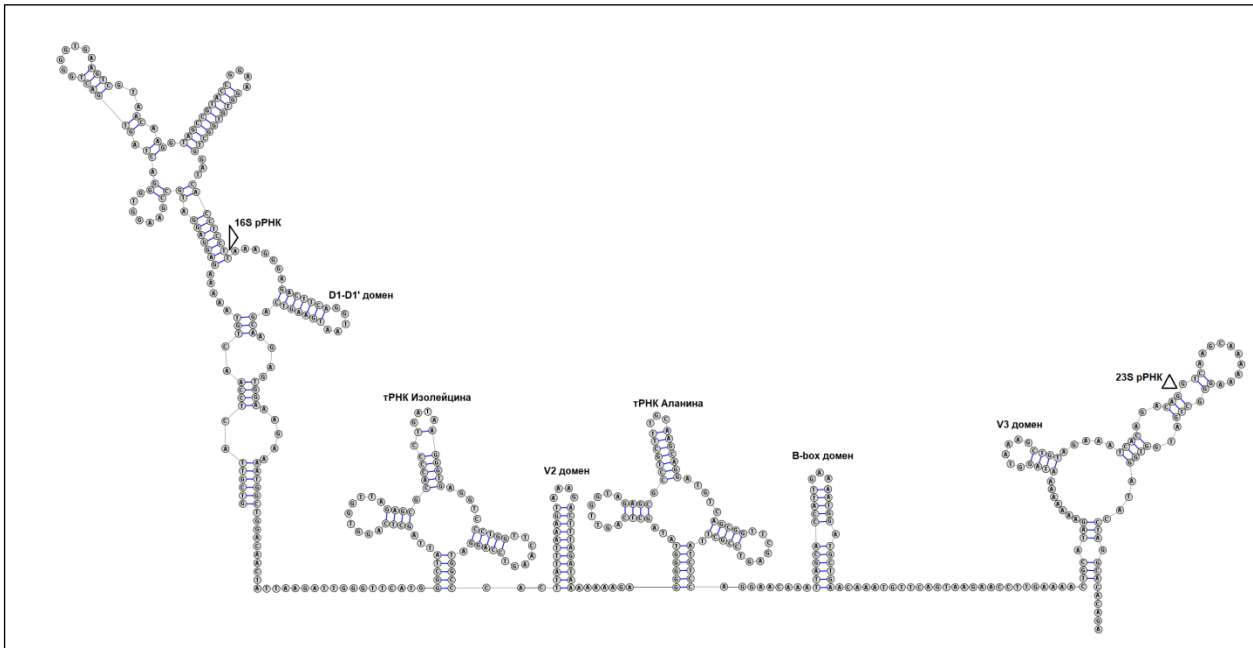


Рисунок 29. Вторичная структура 16S-23S рРНК межгенного транскрибируемого спейсера (ITS) CALU 1807