

*P. dolichoptera* Idelson 1925, *P. d. dolichoptera* Idelson 1925, *P. longiremis* Carlin 1943, *P. major* Burckhardt 1900, *P. euryptera* Wierzejski 1891. На основі аналізу сучасної літератури та власних спостережень представлено морфо-екологічну характеристику роду *Polyarthra* водоемів Українського Ростоцья.

*Ключевые слова:* Rotifera, коловратки, род *Polyarthra*, зоопланктон, фауна, популяції, водоеми, Українское Ростоцье

O.R. Ivanets

Ivan Franko L'viv National University, Ukraine

**TAXONOMIC COMPOSITION OF ROTIFERES OF POLYARTHRA GENUS (ROTIFERA: MONOGONONTA) AND ITS MORPHOLOGICAL AND ECOLOGICAL CHARACTERISTICS IN THE CONDITIONS OF WATER BODIES OF UKRAINIAN ROZTOCHYA**

The results of genus *Polyarthra* (Rotifera: Monogononta) studies of Ukrainian Roztochya natural region are presented. Basis of work makes 754 tests. According the data received in 2001–2014 years during observations of zooplankton of Ukrainian Roztochya there were registered 7 taxa: *P. luminosa* Kutikova 1962, *P. vulgaris* Carlin 1943, *P. dolichoptera* Idelson 1925, *P. d. dolichoptera* Idelson 1925, *P. longiremis* Carlin 1943, *P. major* Burckhardt 1900, *P. euryptera* Wierzejski 1891. On the basis of analysis of modern literature and own data morpho-ecological characteristics of genus *Polyarthra* of of water bodies of Ukrainian Roztochya are presented.

*Keywords:* Rotifera, rotiferes, genus *Polyarthra*, zooplankton, fauna, populations, water bodies, Ukrainian Roztochya

УДК 574.58:582.282.23

В.О. ІВАНИЦЯ, О.Є. БОБРОВА<sup>1</sup>, А.М. ОСТАПЧУК<sup>3</sup>, Й.Б. КРИСТОФФЕРСЕН<sup>2</sup>, Н.В. КОРОТАЄВА<sup>1</sup>, Г.В. ЛІСЮТИН<sup>1</sup>, М.М. ЧАБАН<sup>1</sup>, М. ШТЕННИКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

<sup>2</sup>Інститут морської біології, біотехнології та аквакультури, Грецький центр морських досліджень

Гурнес 71500, 71003 Іракліон, Греція

<sup>3</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

вул. Заболотного, 154, Київ, Україна

**БІОЛОГІЧНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ БАКТЕРІЙ ҐРУНТУ БАТІАЛІ ТА ПОВЕРХНЕВИХ ВОД ЧОРНОГО МОРЯ**

Метагеномний аналіз морської води Одеського прибережжя виявив наявність представників 1006 оперативних таксономічних одиниць (ОТО) 8 основних філіумів домену Bacteria. Встановлено співвідношення функціональних кластерів груп генів метагеному, що відповідають за біологічні процеси, молекулярно-біологічні функції та синтез клітинних компоненти. ПЛР-аналіз виявив присутність в пробах морського ґрунту унікальні специфічні послідовності нуклеотидів для представників анаммоксобактерій родів *Candidatus Brocadia* и *Candidatus Kuenenia*, *Scalidua wagneri* і *Scalidua sorokinii*. Вперше у зразках глибоководного ґрунту сірководневої батіалі Чорного моря виявлено аеробні мікроорганізми, притаманні для поверхневих вод у кількості до 10<sup>4</sup> КУО. За результатами аналізу жирно-кислотного складу та ПЛР-аналізу досліджувані штами віднесені до 15 видів спороутворювальних аеробних бактерій.

*Ключові слова:* Чорне море, батіаль, планктон, мікробіота, біологічна різноманітність, 16S рРНК аналіз, метагеноміка

Чорне море є унікальною морською мікробною екосистемою. Мікробіота Чорного моря є фундаментом та невід'ємною складовою екосистеми, відіграє ключову роль у всіх біогеохімічних процесах, що протікають в ній, виконує функцію "імунної системи" та формує умови існування для інших організмів [3, 4, 5]. Дані літератури щодо біорізноманітності прокариот Чорного моря, в основному, отримані за допомогою класичних мікробіологічних методів, що базуються на виділенні чистих культур [2, 7]. Однак, відомо, що лише приблизно 1% прокариот здатні до культивування і на сьогодні вже відомо, принаймні про 12 нових відділів кандидатів домену Bacteria.

Останні десятиліття відзначаються зростаючим інтересом до вивчення біології глибоководних районів Світового океану, проте до цього часу мало що відомо про мешканців глибин Чорного моря. Здавалось, що в анаеробних умовах можуть існувати лише obligatні анаеробні організми, однак у 2007 році Ю.П. Зайцев з колегами [1, 9] вперше виявили у сірководневій зоні еукаріоти-оксифіони, які знаходяться в спокої, на граничних глибинах Чорного моря.

Метою досліджень було вивчення біологічної різноманітності мікробіоти глибоководних донних осадових сірководневої баталі та морської води Чорного моря за допомогою метагеномного аналізу, молекулярно-генетичних та молекулярно-біологічних методів.

### Матеріал і методи досліджень

Проби води відбирали на глибині 0,5 м на 9 дослідних станціях вздовж Одеського узбережжя та о. Зміїний. Зразки ґрунту з дна Чорного моря відібрано на п'яти станціях на глибині 888-2080 метрів під час рейсу на НДС «Метеор» співробітниками Інституту біології південних морів ім. А.О. Ковалевського та передані нам для мікробіологічних досліджень Інститутом біології моря НАН України. Для виявлення мікроорганізмів використовували класичні мікробіологічні, сучасні молекулярно-біологічні методи та FISH мікроскопію. Жирнокислотний аналіз досліджуваних штамів проводили з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа Agilent 7890. Для підтвердження групової належності та визначення виду застосовували метод мультиплексної ПЛР з використанням групспецифічних праймерів. Дизайн праймерів проводили згідно. Секвенування проводили на платформі Illumina MiSeq. Біоінформативний аналіз необроблених послідовностей здійснювали в програмі QIIME [8].

Дослідження проведено в Одеському національному університеті та Інституті морської біології, біотехнології та аквакультури, Грецького центру морських досліджень. Частина метагеномних досліджень виконано за проектом Ocean Sampling Day в рамках європейської програми MicroB3 спільно з Інститутом Макса Планка. Згідно проекту секвенування морського метагеному здійснювали на платформі Illumina MiSeq в лабораторії Argonne National Institute, США в рамках співпраці по проекту Earth Microbiome Project.

### Результати досліджень та їх обговорення

Первинний таксономічний аналіз метагеному морської води Одеського прибережжя виконаний за проектом Ocean Sampling Day в рамках європейської програми MicroB3 виявив наявність 1006 оперативних таксономічних одиниць (ОТО) 8 основних філіумів домену Bacteria: Proteobacteria 408 ОТО, що складає 40,4%, Cyanobacteria 185 ОТО (18,3%), Bacteroidetes 82 ОТО (8,13%), Actinobacteria 54 ОТО (5,35%), Verrucomicrobia 43 ОТО (4,26%), Firmicutes 19 ОТО (1,88%), Planctomycetes 7 ОТО (0,69%), Acidobacteria 2 ОТО (0,2%) та невідомих, досі не визначених 206 ОТО (20,4%).

У прокариотному метагеномі виявлено групи генів, відповідальні за метаболічні процеси азотних сполук – 15,8%, біосинтетичні процеси – 14,8%, окисно-відновні реакції – 8,8%, метаболічні процеси малих молекул – 8,7%, транспорт – 6%, білковий метаболічний процес – 5,7%, РНК метаболічні процеси – 5,2%, клітинні амінокислотні метаболічні процеси – 4,4%, ДНК метаболічні процеси – 3,8%, вуглеводневі метаболічні процеси – 3,6%, інші функції – 23,1%.

Кластери генів, відповідальні за молекулярні процеси, розподілені наступним чином: зв'язування нуклеотидів – 13,2%, гідролазна активність – 11,2%, оксидоредуктазна активність –

10,8%, трасферазна активність – 10,3%, зв'язування нуклеїнових кислот – 9,7%, зв'язування кофактору – 5,9%, лігазна активність – 4,2%, зв'язування іонів металів – 4,2%, транспортерна активність – 4,1%, АТФазна активність – 2,6%, інші процеси – 24%.

Секвенування 16S рРНК гену та біоінформативний аналіз проб морської води з акваторій острова Зміїний та Одеського прибережжя показали щільне розподілення бактеріальних спільнот серед досліджуваних зразків. Ідентифікацію отриманих послідовностей було проведено до роду. Таксономічний філюм Proteobacteria виявився найбільше представленим серед домену Bacteria. Розподіл на клас Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Epsilonproteobacteria та Deltaproteobacteria відрізнявся в залежності від походження морської проби. Серед досліджуваних зразків у великих кількостях були ідентифіковані мікробні послідовності, що належать до філюмів Cyanobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Planctomycetes та Verrucomicrobia. Філюми Fusobacteria, Tenericutes та Firmicutes виявилися менш представленими. В результаті дослідження виявлені члени оперативних таксономічних одиниць філюмів-кандидатів, таких як SR1, OD1, OP3, OP8, TM6, TM7 та інші. Деякі з виявлених видів були описані раніше для інших частин Світового океану в метагеномних дослідженнях.

Дані ПЛР-аналізу продемонстрували присутність в пробах морського ґрунту з Одеського прибережжя та Одеських лиманів унікальних специфічних послідовностей нуклеотидів для представників анаммоксобактерій родів *Candidatus Brocadia* u *Candidatus Kuenenia*, *Scalidua wagneri* і *Scalidua sorokinii*. Ці хемолітотрофні бактерії окиснюють аміак в анаеробних умовах, при цьому вони використовують нітрит замість кисню як кінцевий акцептор електронів.

Встановлено широке розповсюдження в морській воді представників групи ковзних бактерій порядків Cytophagales (роди Cytophaga, Flexibacter) та Muxobacteriales (роди Muxococcus, Poliangium, Chondromyces), які є активними деструкторами природних високополімерних сполук [6].

У зразках глибоководного ґрунту анаеробної сірководневої батіалі Чорного моря вперше виявлено аеробні мікроорганізми, притаманні для поверхневих вод у кількості до  $10^4$  КУО. За результатами аналізу жирно-кислотного складу та ПЛР-аналізу досліджувані штами були ідентифіковані як: *B. cereus*, *B. pumilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. mycoides*, *B. viscosus*, *B. thuringiensis*, *B. thuringiensis israelensis*, *Paenibacillus macerans*, *Paenibacillus polymixa*, *Paenibacillus alvei*, *Brevibacillus choshinensis*, *Brevibacillus parabrevis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Virgibacillus pantothenicus*. Виникає питання: чи ці мікроорганізми є постійними мешканцями глибоководного ґрунту сірководневої батіалі, чи вони попадають туди з поверхні води, переходять у форми покою і таким чином зберігаються? Теоретично можливо і те і інше, оскільки ці бактерії є факультативними анаеробами і їм властиво використовувати не лише кисень, а і нітрит (та можливо інші акцептори електронів) у процесі дихання.

## Висновки

Проведені метагеномні дослідження значно поглибили наші знання про біологічну різноманітність прокаріотних мікроорганізмів у морській воді та глибоководному ґрунті батіалі Чорного моря та виявили високий функціональний потенціал їх представників. Показано, що екосистема Чорного моря є невичерпним джерелом активних мікроорганізмів для біотехнологічних досліджень. Вперше в глибоководних осадах сірководневої батіалі виявлено та ідентифіковано спектр факультативно-аеробних бактерій, що утворюють ендоспори.

1. *Средоточение* останков оксидионтов и банк живых спор высших грибов и диатомовых в донных отложениях сероводородной батиаля Черного моря / Ю. П. Зайцев, Г. Г. Поликарпов, В. Н. Егоров, Б. Г. Александров [и др.] // Доп. НАН України. – 2007. – № 7. – С. 159–164.
2. *Іваниця В. О.* Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. біол. наук / В. О. Іваниця. – К., 1996. – 47 с.
3. *Роль* анаеробных бактерий в экосистемах Черного моря / М. В. Иванов, Н. В. Пименов, И. И. Русанов [и др.] // Природа. – 1998. – № 6. – С. 97–102.
4. *Поликарпов Г. Г.* Экстремальная жизнь и создаваемая ею самой себе область жизни в батиаля Чёрного моря / Г. Г. Поликарпов // Морський екологічний журнал. – 2012. – № 3 – С. 5–6.

5. Рахімова Е. Л. Екологія миксобактерій юго-запада України / Е. Л. Рахімова, В. А. Іваница // Вісник Одеського національного університету. – 2001. – Вип. 4. – С. 247–250.
6. Сорокін Ю. І. Чорне море. Природа, ресурси / Ю. І. Сорокін. – М.: Наука, 1982. – 217 с.
7. Caporaso J. G. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data / J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger [et al.] // Nature Methods. – 2010. – № 7. – P. 335–336.
8. Kozich J. J. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform / J. J. Kozich, S. L. Westcott, N. T. , S.K. Highlander, & P.D. Schloss // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Vol. 79, № 17. – P. 5112–5120.
9. Zaitsev Yu. P. Recently Discovered New Biospheric Pelocontour Function in the Black Sea Reductive Bathyal Zone / Yu. P. Zaitsev, G. G. Polikarpov // J. Black Sea Mediterranean Environment. – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 151–165.

В.А. Іваньця, А.Е. Боброва<sup>1</sup>, А.Н. Остапчук<sup>3</sup>, Й.Б. Кристофферсен<sup>2</sup>, Н.В. Коротаєва<sup>1</sup>, Г.В. Лисютин<sup>1</sup>, Н.Н. Чабан<sup>1</sup>, Н. Штенников<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Україна

<sup>2</sup>Інститут морської біології, біотехнології та аквакультури, Грецький центр морських досліджень, Греція

<sup>3</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

## БИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ ПОЧВ БАТИАЛИ И ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОД ЧЕРНОГО МОРЯ

Метагеномний аналіз морської води Одеського прибережжя виявив наявність представників 1006 оперативних таксономічних одиниць (ОТЕ) 8 основних відділів домена Bacteria. Установлено співвідношення функціональних кластерів груп генів, що відповідають за біологічні процеси, молекулярно-біологічні функції та синтез клітинних компонентів. ПЦР-аналіз виявив присутність в пробах морської ґрунту унікальних специфічних послідовностей нуклеотидів для представників анаммоксобактерій родів *Candidatus Brocadia* та *Candidatus Kuenenia*, *Scalidua wagneri* та *Scalidua sorokinii*. Вперше в зразках глибоководної ґрунту сероводородної батіали Чорного моря виявлені аеробні мікроорганізми, характерні для поверхневих вод, в кількості до 10<sup>4</sup> КОЕ. По результатам аналізу жирно-кислотного складу та ПЦР-аналізу досліджувані штамми віднесені до 15 видів аеробних бактерій, що утворюють ендоспори.

*Ключеві слова:* Чорне море, батіаль, планктон, мікробіота, біологічне різноманіття, 16S рРНК аналіз, метагеноміка

V.O. Ivanytsia, O.Y. Bobrova<sup>1</sup>, A.M. Ostapchuk<sup>3</sup>, J.B. Kristoffersen<sup>2</sup>, N.V. Korotaeva<sup>1</sup>, G.V. Lisyutin<sup>1</sup>, M.M. Chaban<sup>1</sup>, M. Shtennikov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I.I. Mechnykov Odesa National University, Ukraine

<sup>2</sup> Institute of Marine of Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research, Greece,

<sup>3</sup> D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine, Kyiv

## BIOLOGICAL DIVERSITY OF BATHYAL ZONE SOIL AND SURFACE WATER OF THE BLACK SEA

The metagenome analysis of the seawater along Odesa coast revealed the presence of 1006 operational taxonomic units (OTU) belonging to 8 main phyla of Bacteria Domain. There was established the correlation of functional gene clusters responsible for biological processes, molecular-biological activity and cellular components synthesis. The PCR analysis of marine soil samples revealed the unique specific nucleotide sequences of anammox bacteria genera *Candidatus Brocadia* and *Candidatus Kuenenia*, *Scalidua wagneri* and *Scalidua sorokinii*. For the first time anaerobe microorganisms typical for surface water were explored in samples of the Black Sea deepwater bathyal zone soil in amount up to 10<sup>4</sup> CFU. The fatty acid composition and PCR analysis showed that studied strains belong to 15 species of aerobic endospore-forming bacteria.

**Keywords:** Black Sea, bathyal zone, plankton, microbiota, biological diversity, 16S rRNA analysis, metagenomics