РОЗДІЛ 2. МЕТАГЕНОМНИЙ АНАЛІЗ МІКРОБІОТИ ПРИБЕРЕЖНИХ ВОД ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ, ОСТРОВА ЗМІЙНИЙ ТА ПРИЧОРНОМОРСЬКИХ ЛИМАНІВ

**Іваниця В.О., Васильєва Н.Ю., Штеніков М.Д.,
Лісютін Г.В., Боброва О.Є.**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, м. Одеса, 65082, Україна,
тел. (0482) 68 79 64, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

Анотація

В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу визначено таксономічний склад мікробіомів прибережних вод Одеської затоки, акваторії острова Зміїний та причорноморських лиманів і охарактеризовано біологічну різноманітність прокариот основних відділів доменів Bacteria та Archaea. У воді Одеської затоки виявлені прокариоти домену Bacteria, які належать до відділів: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Tenericutes, Spirochaetia, Fusobacteria, Thermotogae, Deinococci, Aquificae, Chlorobia, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deferribacteres, Planctomycetes, Chlamydiae, Acidobacteria, Nitrospirae, Ignavibacteriae, Thermodesulfobacteria, Dictyoglomia, Elusimicrobia, Synergistia, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes та відділів домену Archaea - Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota. У Хаджибейському лимані, Одеській затоці та акваторії о. Зміїний переважали представники відділу Proteobacteria, а в Сухому і Дністровському лиманах - відділу Cyanobacteria. У результаті біоінформатичного функціонального аналізу в загальному прокариотному метагеномі мікробіому води Одеської затоки визначено співвідношення генів, що відповідають за протікання біологічних процесів, кодують інформацію про молекулярні функції молекулярні функції та несуть інформацію про синтез клітинних компонентів.

Ключові слова: Чорне море, Одеська затока, причорноморські лимани, акваторія острова Зміїний, прокариоти, метагеномний аналіз, таксономічна різноманітність

Вступ

Мікроорганізми відіграють важливу роль у морських екосистемах [5, 7]. Проведені дослідження у відкритому океані та прибережних водах [8, 41, 27] допомогли встановити просторовий розподіл прокаріот [38, 41] їх таксономічну різноманітність [36] та роль у біогеохімічних процесах [19]. Мікробіологічні дослідження, проведені у другій половині XX століття, дали перше уявлення про таксономічний склад мікроорганізмів, що населяють прибережні та глибоководні райони Чорного моря [5, 7]. Дослідження мікробіологів Одеського національного університету були фрагментарними та дозволили встановити кількісний склад гетеротрофних бактерій, вивчити окремі групи мікроорганізмів та вплив навколишнього середовища на них [1, 6].

Чорне море це унікальна морська екосистема з багатою мікробною спільнотою, яка впливає на всі біогеохімічні процеси, що відбуваються в поверхневому кисневмісному, проміжному і нижньому безкисневому шарах. Тим не менш, бактеріальна різноманітність Чорного моря ще мало вивчена. Якщо проведені деякі метагеномні дослідження води Чорного моря пролили світло на таксономічний склад морських мікроорганізмів [24, 44], то мікробна різноманітність причорноморських лиманів, які тісно пов'язані з Чорним морем залишається практично невідомою.

Дослідження з використанням класичних методів виділення та вивчення чистих культур мікроорганізмів не дозволяють в повній мірі встановити таксономічний склад морської мікробіоти, оскільки вважається, що тільки близько 1% від існуючих прокаріотів піддаються культивуванню на живильних середовищах [21, 26]. Проведені метагеномні дослідження допомогли сформулювати уявлення про розподіл прокаріотних мікроорганізмів, їх таксономічну різноманітність і функціональний вміст генів [39, 43], а також оцінити їх роль у біогеохімічних процесах [19].

Для більш глибокого розуміння процесів, що протікають у морській екосистемі, важливо знати біологічну різноманітність популяцій представників прокаріотів, які мешкають у цих водах, та їх представництво в загальному мікробіомі.

2.1. Методи дослідження

Проби морської води для дослідження мікробної різноманітності відбирали в трьох повторях в червні 2014 року в районах акваторії острова Зміїний в точці з координатами 45°25'426"N, 30°20'378"E (рис.2.1) та по одній пробі в нижній частині Дністровського (Dnst), Сухого (Sukh) та Хаджибейського (Khad) лиманів в точках з координатами: Khad - 46°54'585"N, 30°65'1366"E, Sukh - 46°35'2112"N, 30°64'7934"E і Dnst - 46°07'3248"N, 30°45'4627"E та гідробіологічної станція ОНУ імені І.І. Мечникова (46°21'495"N, 30°43'223"E). Проби відбирали на глибині один метр від поверхні в стерильні скляні ємності на 750 мл. Відібрані зразки зберігали при -4 °С впродовж до 6 год та фільтрували через мембранні фільтри з діаметром пор 0,22 мкм (Sartorius) для збору мікроорганізмів.

**Рис. 2.1. Карта з позначенням місць відбору проб.
1 - Одеська затока, 2 - Острів Зміїний, 3 - Дністровський лиман,
4 - Сухий лиман, 5 - Хаджибейський лиман**

Нуклеїнові кислоти виділяли з зібраних шляхом фільтрування мікроорганізмів з допомогою Power Water DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF; МО BioLaboratories). Екстракцію ДНК здійснювали відповідно інструкції виробника (МО BioLaboratories). Розміри ізольованої ДНК контролювали з допомогою електрофорезу в 0,8% агарозному гелі.

Дизайн праймерів (табл. 2.1) відповідав протоколу Kozich et al., [30], за модифікацією Капорасо [14] для більш ефективного двостороннього індексування. Праймери Капорасо використовували в проєкті Мікробіом Землі [20]. Праймер Read1 складається з послідовностей pad+linker+16S (F), Read2 – з послідовностей pad+linker+16S (R), Index1 – зворотний комплемент праймера Read2.

ПЛР здійснювали з застосуванням наборів КАРА HiFi HotStart PCR kits (Капа Biosystems). Кожна ПЛР суміш складалась з 0,2 М Trehalose, 5 μ l Fidelity buffer, 0,75 μ l КАРА dNTP mix, 0,3 μ M прямого і зворотного праймера, 0,5 одиниць КАРА HiFi полімерази, біля 25 нг матричної ДНК, і суміш доводили до 25 мкл дейонізованою водою. Умови для теплових циклів були наступними: 95 °C - 3 хв, потім 27 циклів при 98 °C - 20 сек, 61 °C - 10 сек, і 72 °C - 15 сек. Фінальна елонгація продовжувалась 5 хв при 72 °C.

ПЛР продукти очищали, використовуючи AMPure XP магнітні кульки. Кількість очищеної ДНК визначали флуориметрично з використанням набору Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit і портативного флуориметра. Далі готували еквімолярну суміш із очищених ПЛР продуктів для того, щоб отримати рівний вміст із кожного зразка. В суміш для секвенування також включали пустий бланк екстракції (проба негативного контролю) із набору Power Water DNA isolation kit. Кінцевий пул отриманої бібліотеки 16S rRNA клонів оцінювали кількісно з використанням КАРА Universal qPCR kit.

Секвенування здійснювали на платформі Illumina MiSeq з використанням набору реагентів v2 (MiSeq Reagent kit v2) з 250 циклами для Read1, 8 циклів для кожного з індекс F і індекс R піків і 250 циклами для Read2.

Таблиця 2.1

Використані праймери

Name	Adapter	Index	Primer pad	Linker	16S primer
SB502 ^(F)	AATGATACGGCGA CCACCGAGATCTACAC	CGTTACTA	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB504 ^(F)	AATGATACGGCGACC ACCGAGATCTACAC	TACGAGAC	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB505 ^(F)	AATGATACGGCGGAC CACCGAGATCTACAC	ACGTCTCG	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB501 ^(F)	CAAGCAGAAAGACG GCATACGAGAT	CTACTATA	TATGGTAATT	GT	GTGCCAGCMGCC GCGGTAA
SB704 ^(R)	CAAGCAGAAAGACG GCATACGAGAT	CATAGAGA	AGTCAGTCAG	CC	GGACTACHVGGG TWTCTAAT

^(F) - Forward primer, ^(R) - Reverse primer

Отримані послідовності після секвенування аналізували з допомогою двох біоінформаційних програм QIIME (Quantative Insights into Microbial Ecology) і SILVAngs. Якість рідів перевіряли з використанням програми FastQC v.0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Для збирання парних кінців рідів, що перекриваються, і генерування зібраних рідів в окремий файл використовували інструмент PEAR [47]. Отримані парні ріди переводили в формат fasta.

На першому етапі біоінформаційний аналіз отриманих нуклеотидних послідовностей здійснювали в програмі SILVAngs [37]. Для другого варіанту аналізу усі маніпуляції виконували в операційній системі Bio-linux7, де першим етапом також була перевірка якості рідів, їх очищення від контамінацій і повторна перевірка якості. Отримані послідовності використовували як вхідні дані для програми QIIME, version 1.8.0 [13]. Для візуалізації результатів використовували додаток MEGAN та інтерактивний візуалізатор Krona (<https://github.com/marbl/Krona/wiki>).

2.2. Мікробна різноманітність прибережних вод о. Зміїний

В результаті секвенування було отримано 80206 сирих послідовностей, які належали досліджуваним зразкам ZM1, ZM2, ZM3 проб морської води. Демультіплексування було виконано автоматично програмою MiSeq Reporter по завершенню секвенування. Усі ріди були анотовані до своїх зразків у відповідності з унікальною індексною послідовністю для кожного зразка. Якість послідовностей перевіряли в програмі Fastqc, очищали від адаптерів, праймерів і ділянок, що часто повторювалися, після чого проводили повторний контроль їх якості. В підсумку було отримано 79748 послідовностей, які були використані як вхідні дані для біоінформатичного аналізу.

У результаті аналізу в програмі SILVAngs класифіковано 99,11% усіх послідовностей з використанням референсної бази даних Silva і лише 0,82% послідовностей були ідентифіковані як “no relative”.

Для аналізу в програмі QIIME використали стратегію зборки *de novo*. На підставі ідентичності послідовностей очищені ріди були згруповані в операційні таксономічні одиниці (ОТО) з по-

рогом подібності на рівні 97% [32]. Більша частина послідовностей (99,8%) була класифікована в результаті роботи в QIIME, а 0,2% послідовностей не мало ніяких гомологів. У порівнянні з аналізом SILVAngs використання QIIME дозволило класифікувати отримані ОТО до рівня роду.

На рисунку 2.2 наведено альфа-різноманітність (тобто індекс видового багатства) в досліджуваних зразках, отриманих в результаті роботи в QIIME. Видове багатство залежить від обсягу вибірки, тому для порівняння вибірок, нерівних за чисельністю, застосовується метод розрідження (rarefaction) — перерахунок кількості видів на заданий (менший, ніж у досліді) обсяг вибірки.

За результатами аналізу отриманих ОТО у SILVAngs та QIIME ідентифікували 10 головних відділів (філіумів) домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, SR1, Fusobacteria та Firmicutes (рис. 2.3).

Рис. 2.2. Крива розрідження (rarefaction curve) для аналізу альфа-різноманітності при рівні подібності 97%. Криві показують залежність видового багатства – числа таксонів (taxa) від обсягу вибірки – числа ОТО (видів)

Рис. 2.3. Таксономічний профіль на рівні відділів в прибережних водах острова Зміїний, отриманий у програмі SILVAngs. Графічне представлення частоти послідовностей у досліджуваних зразках вказує на основні відділи виявлені у домену Bacteria

Примітка: Колір символу визначає приблизну частоту таксонів усередині зразка. Розмір символу є кількістю ОТО

На цьому ж рівні були виявлені деякі важливі відмінності в таксономічних розподілах між двома біоінформатичними програмами. Дані, отримані в SILVAngs, вказують на наявність кандидатних відділів, таких як: BD1-5, BHI80-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 та TM6 (рис. 2.3). Всі ці підрозділи були сформовані на основі вивчення даних 16S rRNA у метагеномних дослідженнях зразків різних екологічних ніш. Більшість із цих представників були вперше описані для проб води з Слоустоунського національного заповідника [17].

Програма QIIME дала можливість визначити у досліджуваних зразках лише представників кандидатного відділу CD SR1 (рис. 2.4). Але тут відзначалася група, позначена як “Others”. Вона включає представників, про яких існує занадто мало інформації, або вона відсутня в референсній базі даних Greengenes, або можна припустити, що їх представники знаходяться в дуже малих кількостях. Це можна пояснити тим, що Silva – це база даних для 16S rRNA послідовностей морських зразків, у той час як база даних Greengenes зібрана з інформації інших баз даних і включає достатній набір послідовностей для повного філогенетичного аналізу.

У програмі SILVAngs виявлено невелику кількість послідовностей архей (менше 100 послідовностей). Вони належали до двох класів: Thaumarchaeota та Euryarchaeota (рис. 2.3).

Як видно з таблиці 2.2, найбільш поширеним відділом домену Bacteria є Proteobacteria (51,4% від усіх послідовностей). Найбільш представленими класами серед Proteobacteria були Gammaproteobacteria і Alphaproteobacteria. Вивчені зразки характеризуються відносно низькою кількістю представників інших класів цього відділу, таких як Betaproteobacteria, Epsilonproteobacteria та Deltaproteobacteria.

Другим значно поширеним відділом домену Bacteria виявилися представники Bacteroidetes (17,3%). Ця таксономічна група включає неспоротвірні грамнегативні анаеробні бактерії, які значно поширені в морському середовищі і донних відкладеннях. З цього відділу найбільш представленими є члени класів Flavobacteria та Sphingobacteria.

Рис. 2.4. Таксономічний склад філогенетичних груп на рівні відділів в прибережних водах острова Зміїний, визначених у QIIME

Примітка: позначення назв відділів дивись у Таблиці 2.2

Таблиця 2.2

Кількісний розподіл представників відділів домену Bacteria на рівні відділів в прибережних водах острова Зміїний

Легенда	Відділ домену Bacteria	Total %	*Zm 1, %	*Zm 2, %	*Zm 3, %
	Proteobacteria	45.4	52.4	52.3	49.6
	Bacteroidetes	14.4	15.9	16.2	19.7
	Cyanobacteria	18.9	11.6	11.3	10.4
	Actinobacteria	7.8	4.9	5.7	4.8
	Verrucomicrobia	2.7	3.7	3.4	3.4
	Planctomycetes	1.1	1.3	1.2	1.8
	Tenericutes	0.5	0.8	0.5	0.6
	SR1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Fusobacteria	0.1	0.1	0.1	0.0
	Firmicutes	0.0	0.0	0.1	0.0
	Other	9.0	9.2	9.1	9.4

Бактерії відділу *Cyanobacteria*, відомі як типові морські мешканці, представлені у кількості 11,1% від усіх виявлених послідовностей.

У досліджуваному районі представники відділу *Actinobacteria* склали 5,1% від усієї різноманітності прокаріотів. У цьому відділі найбільш численними були бактерії порядку *Actinomycetales*, добре відомі як продуценти антибіотиків.

Бактерії відділу *Verrucomicrobia* виявлено у кількості 3,5% від загальної кількості ОТО. Цей відділ характеризується представниками водних та ґрунтових ніш проживання. Найбільш поширеними серед цього відділу у досліджених зразках були бактерії порядків *Opitutales* та *Verrucomicrobiales*.

Відділ *Planctomycetes* представлений 1,4% від усієї бактеріальної різноманітності. Ці види колонізують солоні та прісні водойми.

Аналіз отриманих послідовностей QIIME дозволив провести ідентифікацію до рівня роду. У ході цього аналізу було використано програму MEGAN, що дозволило наочно візуалізувати отримані результати. Рисунок 2.5 ілюструє так звані таксономічні хмари для зразків Zm1, Zm2 та Zm3. Розмір шрифту у яких відображає рівень бактеріального розподілу представників зазначеної групи у зразках.

Як видно з рисунку 2.4, крім відділів *Bacteroidetes* і *Actinobacter* (описаних вище), широко представлені члени роду *Pseudoalteromonas* - неспороутворюючі, аеробні, грамнегативні морські бактерії.

У досліджуваних зразках виявлені представники роду *Vibrio*, які зазвичай живуть у морській воді і є факультативними анаеробами. Такі роди як *Marivita*, *Loktanella* та *Parasoccus* є представниками родини *Rhodobacteraceae*. Члени цієї родини виявлені у прибережних водах Атлантичного та Тихого океанів [9]. *Rhodobacterales* також відомі здатністю до фотосинтезу.

Рисунок 2.5 демонструє високий вміст представників роду *Haliea* у досліджуваних зразках. Із літератури дуже мало відомо про цей рід. Це аеробні, грамнегативні бактерії, які були виділені з поверхневих прибережних вод Середземного моря [42].

Члени роду *Acrobacter*, що виявлені у зразках Zm1 та Zm3, є грамнегативними, спіралеподібними бактеріями родини *Campylobacteraceae*, які займають широкий спектр екологічних ніш.

Серед інших представників таксономічних родів в незначній кількості виявлено *Lutibacter*, *Robigininales*, *Tenacibaculum*, *Wino-gradskyella*, *Lewinella*, *Bacillariophyta*, *Cryptomonadaceae*, *Rhodopirellula*, *Brevundimonas*, *Maricaulis*, *Phaeobacter*, *Erythrobacter*, *Prostheco bacter*, *Spartobacteria*, *Coraliomargarita*, *Acholeplasma*, *SR1*, *Enterovibrio*, *Aliivibrio*, *Pseudomonas*, *Oceanospirillum*, *Oceaniserpentilla*, *Neptunomonas*, *Marinomonas*, *Umboniibacter* та інші.

За підсумками проведеної роботи в софті QIIME отримано файл формату біом (*Biological Observation Matrix*) з картою всіх виявлених ОТО. Цей файл використаний для візуалізації філогенії у програмі MEGAN. Рисунок 2.6 ілюструє філогенетичне дерево, на якому відображена спорідненість між усіма ОТО досліджуваних зразків, та демонструє, що мікробіота досліджуваної води є багатогою та різноманітною.

Таким чином, в результаті метагеномного 16S рРНК аналізу описано різноманітність бактеріальних популяцій, що мешкають у поверхневих водах острова Зміїний. Було отримано приблизно 3200 ОТО у досліджуваних морських пробах. Виявлено 10 основних відділів домену *Bacteria*: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*, *SR1*, *Fusobacteria* та *Firmicutes*. Серед них визначені домінуючі класи, такі як *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Flavobacteria*, *Actinobacteria*, *Sphingobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Opitutae*, *Planctomycetacia*, *Epsilonproteobacteria*, *Verrucomicrobiae*, *Mollicutes*.

Більшість вивчених бактеріальних представників відносяться до порядків *Flavobacteriales*, *Alteromonadales*, *Rhodobacterales*, *Actinomycetales*, *Acidimicrobiales*, *Sphingobacteriales*, *Pseudomonadales*, *Rhodospirillales*, *Planctomycetales*, *Vibrionales*, *Puniceicoccales* та інших.

В результаті таксономічного аналізу ідентифіковано багату різноманітність родин та родів. Найбільш представленими родами у досліджуваних зразках були: *Marivita*, *Loktanella*, *Paracoccus*,

2.3. Мікробна різноманітність у воді причорноморських лиманів

У результаті проведених досліджень з ДНК досліджуваних зразків води лиманів Хаджибейський лиман (Khad), Сухий лиман (Sukh) та Дністровський лиман (Dnstr) після очищення отримано 57 970 послідовностей. Після завершення секвенування демультіплексування було зроблено програмним забезпеченням MiSeq Reporter. Всі отримані послідовності 16S рРНК прокласифіковані в Ribosomal Data Project-класифікаторі QIIME.

Ідентифікацію послідовностей здійснено до рівня роду. Проте розбіжності у складі бактеріальних співтовариств досліджуваних лиманів помітні вже на таксономічному рівні відділу (рис. 2.7).

Рис. 2.7. Таксономічний склад філогенетичних груп на рівні відділів в воді причорноморських лиманів, визначених у QIIME

Примітка: Khad – Хаджибейський лиман, Sukh – Сухий лиман, Dnstr – Дністровський лиман

Так, більшість бактеріальних послідовностей, виявлених у воді Сухого (Sukh) і Дністровського (Dnstr) лиманів належали до відділу Cyanobacteria (72,2% і 68,0%, відповідно) на відміну від зразка Хаджибейського (Khad) лиману, де значно переважали представники відділу Proteobacteria (62,4%), і лише 12,6% послідовностей були віднесені до відділу Cyanobacteria, у той час як Proteobacteria склали 7,4% від усіх послідовностей в пробі Sukh і 5,7% – Dnstr. За домінуючим відділом у зразках всіх лиманів стоять представники відділів Bacteroidetes (Khad – 11,1%, Sukh – 5,1%, Dnstr – 7,2%), Actinobacteria (Khad – 8,1%, Sukh – 6,3%, Dnstr – 7,2%) 1,6%, Sukh – 3,9%, Dnstr – 6,1%), Planctomycetes (Khad – 1,6%, Sukh – 2,1%, Dnstr – 1,3%).

Більшість послідовностей, ідентифіковані як Proteobacteria, віднесені до класів Gammaproteobacteria (Khad – 45,6%, Sukh – 3,9%, Dnstr – 2,2%) та Alphaproteobacteria (Khad – 10,7%, Sukh – 2,5%, Dnstr – 2,0%). На відміну від цього Betaproteobacteria представлені в основному лише у зразку лиману Хаджибей (5,8%). У воді Сухого та Дністровського лиманів їх вміст становив 0,6%. Відзначено низький вміст представників класу Deltaproteobacteria (0,1% у зразку кожного лиману), а представників Epsilonproteobacteria не було виявлено у досліджуваних зразках.

Аналіз на таксономічному рівні "порядок" (рис. 2.8) показав, що Family II відділу Cyanobacteria склала 67,1% і 65,9% у зразках Sukh і Dnstr, відповідно, і 0,2% для Khad. У той же час у Khad домінували представники порядку Pseudomonadales (43,8%). Представники цього порядку були виявлені у малих кількостях у воді Сухого та Дністровського лиманів (2,2% та 0,2%, відповідно). За цими домінуючими порядками розташувалися порядки Rhodobacterales (Khad – 8,2%, Sukh – 2,0%, Dnstr – 2,2%), Flavobacteriales (Khad – 8,6%, Sukh – 3,0%, Dnstr – 5,5%), Actinomycetales – 4,7%, Dnstr – 4,6%), Acidimicrobiales (Khad – 2,4%, Sukh – 1,0%, Dnstr – 2,9%), Planctomycetales (Khad – 1,6%, Sukh – 2,1%, Dnstr – 1,3%), Burkholder (Khad – 5,5%, Sukh – 0,1%, Dnstr – 0,1%), та члени класу Spartobacteria (Khad – 0,9%, Sukh – 1,9%, Dnstr – 5,3%).

На діаграмах (рис. 2.9) показані найбільш представ-

Рис. 2.8. Таксономічний розподіл філогенетичних груп на рівні порядку в воді причорноморських лиманів, визначених у QIIME

Примітка: Khad - Хаджибейський, Sukh – Сухий лиман,
Dnstr – Дністровський лиман

лені роди, ідентифіковані у досліджуваних зразках лиманів. У Хаджибейском лимані виявлено домінування таких бактерій, як *Acinetobacter*, *Actinobacteria*, *Rhodobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Marivita*, *Phaeobacter*, представники родини *Comamonadaceae* та ін. У воді Сухого та Дністровського лиманів переважали представники відділу *Cyanobacteria* та *Actinobacteria*, роду *Planctomycetes*, *Spartobacteria* та ін. У Сухому лимані також відзначено високий вміст *Bacillariophyta*.

Проведений аналіз альфа-різноманіття описує кількість різних таксонів в досліджуваних зразках води кожного з лиманів. Наведені на рисунку 2.10 графіки свідчать, що кожна проба характеризується високою різноманітністю.

Отримане методом UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) дерево, на підставі аналізу спільноти досліджуваних лиманів, показує, що за різноманітністю прокариот Сухий і Дністровський лимани більш подібні між собою і групуються окремо від Хаджибейського лиману (рис. 2.11).

Рис. 2.10. Крива розрідження (rarefaction curve) для аналізу альфа-різноманітності при рівні подібності 97%.
Криві показують залежність видового багатства – числа таксонів (taxa) від обсягу вибірки – числа ОТО (видів)

Рис. 2.11. Кластеризація лиманів за різноманітністю прокаріот з використанням методу UPGMA

Аналіз бета-різноманітності, який призначений для порівняння видового складу спільнот різних мікробіомів і оцінюється за показниками подібності між спільнотами, шляхом обчислення умовних дистанцій між спільнотами за методом UniFrac також був виконаний у програмі QIIME. Результати аналізу збігаються з результатами кластеризації за методом UPGMA. Отримана матриця (рис. 2.12) відстаней використана в аналізі головних координат (PCoA - Principal Coordinates Analysis) для візуалізації відмінностей між лиманами.

Рис. 2.12. Аналіз головних координат (PCoA) метабеномів причорноморських лиманів на основі матриці відстаней

Примітка: Khad - Хаджибейський, Sukh – Сухий лиман, Dnst – Дністровський лиман; на осі абсцис вказано відсоток загальної дисперсії для PC1

2.4. Мікробна різноманітність в прибережних водах Одеської затоки

У результаті метагеномного аналізу води Одеської затоки Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І.І. Мечникова виявлені представники відділів домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Tenericutes, Spirochaetia, Fusobacteria, Thermotogae, Deinococci, Aquificae, Chlorobia, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deferribacteres, Planctomycetes, Chlamydiae, Acidobacteria, Nitrospirae, Ignavibacteriae, Thermodesulfobacteria, Dictyoglomia, Elusimicrobia, Synergistia, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes та домену Archaea: Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota, що свідчить про широкий спектр прокаріотних мікроорганізмів у досліджуваній пробі морської води [2].

Слід відмітити, що основні відділи домену Bacteria Одеської затоки були ідентифіковані також шляхом метагеномного аналізу 16S рРНК проб води з акваторії острова Зміїний [12] і проб з чорноморських лиманів [11], але різнилися у кількісному вмісті ідентифікованих послідовностей. Так, в морській воді акваторії острова Зміїний кількість ідентифікованих послідовностей, що були віднесені до відділу Firmicutes, склала лише 0,1% [11], а в морській воді з Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції частка ідентифікованих послідовностей відділу Firmicutes склала 5,0% (табл. 2.3).

Найбільш поширений відділ Proteobacteria (68,0%) представлений класами Gammaproteobacteria (63,0%) і Alphaproteobacteria (31,0%). Кількість Betaproteobacteria склала 4,0% від усіх послідовностей, а Deltaproteobacteria близько 2,0% (рис. 2.13). Аналогічну картину спостерігали, у воді Чорного моря акваторії острова Зміїний [11]. При дещо меншій загальній кількості представників відділу Proteobacteria (51,4%) найбільш представленими були Gammaproteobacteria і Alphaproteobacteria. За даними Costantino et al [15] в зразках води, зібраних з глибини 20-40 м члени групи Gammaproteobacteria були присутні на усіх глибинних ділянках і представляли собою панівний таксон.

Таблиця 2.3

Кількісний розподіл представників домену *Bacteria* на рівні відділів в воді Одеської затоки

Відділ	N, %	Відділ	N, %
Proteobacteria	68,0	Verrucomicrobia	0,07
Bacteroidetes	19,0	Deferribacteres	0,06
Firmicutes	5,0	Planctomycetes	0,06
Actinobacteria	4,0	Chlamydiae	0,06
Cyanobacteria	2,0	Acidobacteria	0,06
Tenericutes	0,6	Nitrospirae	0,05
Spirochaetia	0,4	Ignavibacteriae	0,05
Fusobacteriia	0,3	Thermodesulfobacteria	0,04
Thermotogae	0,1	Dictyoglomia	0,02
Deinococci	0,1	Elusimicrobia	0,01
Aquifcae	0,09	Synergistia	0,01
Chlorobia	0,09	Fibrobacteria	0,008
Chloroflexi	0,08	Gemmatimonadetes	0,006

Представники класу Betaproteobacteria представлені родинami Burkholderiaceae, Comamonadaceae, Alcaligenaceae, Oxalobacteraceae порядку Burkholderiales.

Серед бактерій класу Deltaproteobacteria визначено порядки Desulfovibrionales, Desulfobacterales і Desulfuromonadales, тобто сульфатредуквальні бактерії, які, як показали Costantino з колегами, переважно зустрічалися на глибинах нижче хемоклину [15].

Серед представників класу Gammaproteobacteria, згідно отриманого нами таксономічному профілювання, ідентифіковані послідовності віднесені до порядків Alteromonadales (родини Pseudomonadaceae і Alteromonadaceae), Pseudomonadales (родини Pseudomonadaceae і Moraxellaceae), Enterobacterales (родини Enterobacteriaceae, Yersiniaceae, Erwiniaceae) та Vibrionales (родина Vibrionaceae).

Рис. 2.13. Таксономічний склад бактерій відділу Proteobacteria в воді Одеської затоки

Другим за кількістю представленим відділом домену Bacteria є Bacteroidetes (19,0%). Ця таксономічна група включає неспороутворювальні грамнегативні анаеробні бактерії, які дуже поширені в морському середовищі і донних відкладеннях. Згідно отриманим нами даних, представники класу Flavobacteria найбільш чисельні серед відділу Bacteroidetes (89,0%). Кількість ідентифікованих послідовностей, що віднесені до класів Sphingobacteria, Cytophagia та Bacteroidia була набагато меншою (рис. 2.14), що співпадає з результатами отриманими для води з акваторії острова Зміїний [11].

Чисельність представників відділу Firmicutes (рис. 2.15) була набагато більша ніж в воді акваторії острова Зміїний [4] і складала 5,0%. Серед представників цього відділу ідентифіковані послідовності, що відносяться до порядків Bacillales і Lactobacillales. Порядок Bacillales представлений родинami Bacillaceae, Staphylococcaceae, Paenibacillaceae, Listeriaceae, Planococcaceae, Alicyclobacillaceae, порядок Lactobacillales – родинami Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Streptococcaceae.

Рис. 2.14. Таксономічний склад бактерій відділу Bacteroidetes в воді Одеської затоки

Рис. 2.15. Таксономічний склад бактерій відділу Firmicutes у воді Одеської затоки

Чисельність представників відділу Actinobacteria складала 4% від усіх виявлених послідовностей (рис. 2.16). Серед представників цього відділу ідентифіковані послідовності, що відносяться до порядків Micrococcales (34%), Corynebacteriales (27%), Streptomyetales (13%), Pseudonocardiales (6%), Micromonosporales (4%), Propionibacteriales (3%), Actinomycetales (2%), Streptosporangiales (2%).

Бактерії відділу Cyanobacteria (рис. 2.17), що відомі як типові морські мешканці, складають лише 2,0% від усіх виявлених послідовностей. Найбільш поширеними серед них були члени класів Synechococcales (67,0%) і Oscillatoriophyceae (17,0%). Представники порядків Nostocales, Gloeobacteria та Pleurocapsales присутні у незначній кількості. При цьому, у воді акваторії острова Зміїний кількість представників Cyanobacteria досягали 11,1% від усіх виявлених послідовностей [11].

Досить цікавим є виявлення 0,5% представників домену Archaea (рис. 2.18) у прибережній воді Одеської затоки (відділи Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota). Thaumarchaeota є хемолітотрофами, здатними окиснювати аміак, присутність якого часто відмічається у глибинних водах [9]. А Euryarchaeota у більшості залежить від кількості та якості органічних поживних ресурсів, що підтверджує їх гетеротрофний (або міксотрофний) тип метаболізму [31]. Crenarchaeota також відносяться до архей, та їх фізіолого-біохімічні властивості більш різноманітні: серед Crenarchaeota є ацидофіли і нейтрофіли, суворі і факультативні анаероби та облигатні аероби, хемолітоавтотрофи і хемоорганотрофи. Вони можуть використовувати сірку у своєму метаболізмі [3].

У рамках програми Єдиний день відбору проб [29] **Ocean Sampling Day (EU MicroB3 project)** 21 червня 2014 р. в Одеській затоці в точці з координатами 46°21'495"N, 30°43'223"E було відібрано 20 л води з глибини один метр від поверхні води. Воду фільтрували через мембранні шприцеві фільтри Sterivex (діаметр пор 0,22 мкм) в лабораторії. Фільтри заморожували та транспортували для подальшого дослідження в сухому льоду. Виділення нуклеїнових кислот та створення бібліотеки клонів здійснювали

Рис. 2.16. Таксономічний склад бактерій відділу Actinobacteria в воді Одеської затоки

Рис. 2.17. Таксономічний склад бактерій відділу Cyanobacteria в воді Одеської затоки

Рис. 2.18. Таксономічний склад відділів домену Archaea в воді Одеської затоки

в лабораторії інституту Макса Планка.(Німеччина), а секвенування з індивідуальними індексами для кожної проби - на платформі Illumina MiSeq в США в лабораторії Argonne National Institute в рамках співпраці по проекту Earth Microbiom Project. Всього в проекті було досліджено проби води з 29 місць Світового океану (рис. 2.19).

Отримані в результаті секвенування послідовності завантажені до бази даних ENA (European Nucleotide Archive) та є відкритими для кожного користувача. Набір даних метабеномного зразка Чорного моря, який було відібрано при виконанні цього проекту має ідентифікатор ERR770983. До серверу MG-RAST набір даних ERR770983 був завантажений 07.10.2016. Він містить 1 375 335 послідовностей загальною кількістю 426 973 699 пар баз із середньою довжиною 310 пар нуклеотидів. З перевірених послідовностей 81 610 послідовностей (5,93%) не пройшли контроль якості. Дублікатами зчитування виявилось 1 293 725 послідовностей.

За результатами аналізу анотовано 2500 послідовностей, що містять гени рибосомної РНК, 692 404 послідовності, що містять

Рис. 2.19. Карта місць учасників проєкту Ocean Sampling Day (EU MicroB3 project)

передбачені білки з відомими функціями, і 581 743 послідовності, що містять передбачені білки з невідомою функцією.

За функціональною категорією інші анотовані послідовності рекласифіковані за трьома категоріями: біологічний процес, молекулярна функція та клітинний компонент, які ієрархічно організовані за рівнями.

На рисунку 2.20 наведено таксономічний склад (А), біологічні процеси (Б), молекулярні функції (В), компоненти клітини (Г) мікробіоти Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції станом на червень 2014 р.. Метагеномний аналіз виявив 8 основних відділів серед домену Bacteria, а саме (рис. 2.20 А): *Proteobacteria* (40,4%), *Unassigned* (20,4%), *Cyanobacteria* (18,3%), *Bacteroidetes* (8,13%), *Actinobacteria* (5,35%), *Verrucomicrobia* (4,26%), *Firmicutes* (1,88%), *Planctomycetes* (0,69%), *Acidobacteria* (0,2%) [29].

У результаті біоінформатичного функціонального аналізу в загальному прокаріотному метагеномі мікробіому води Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції встановлено,

Рис. 2.20. Таксономічний склад (А), біологічні процеси (Б), молекулярні функції (В), компоненти клітини (Г) мікробіоти Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції станом на червень 2014 р.

що більшість генів загального геному відповідальні за процеси метаболізму азотних сполук (Nitrogen compound metabolic process) – 15,8%, біосинтетичні процеси (Biosynthetic process) – 14,8%, окисно-відновні метаболічні процеси (Oxidation-reduction metabolic process) – 8,8% та процеси метаболізму малих молекул (Small molecule metabolic process) – 8,7 (рис. 2.20 Б).

Серед генів загального геному, що кодують інформацію про молекулярні функції максимальна кількість відповідає за зв'язування нуклеотидів (Nucleotide binding) – 13,2%, гідролазну активність (Hydrolase activity) – 11,2%, оксидоредуктазну активність (Oxidoreductase activity) – 10,8%, трансферазну активність (Transferase activity) – 10,3%, зв'язування кофактору (Cofactor binding) – 5,9%. За транспортну активність (Transporter activity) відповідає 4,1%, а за АТФазну активність (ATPase activity) – 2,6% (рис. 2.20 В).

Серед групи генів, що несуть інформацію про синтез клітинних компонентів, виявлено наступний розподіл: мембрана (Membrane) - 56,3%, цитоплазма (Cytoplasm) – 21,2%, рибосома (Ribosome) – 9,8%, двокомпонентний АТФазний комплекс, що транспортує протони (Proton-transporting two-sector ATPase complex) - 2% (рис. 2.20 Г).

Обговорення

Як видно з рисунку 2.21 таксономічна різноманітність прокаріотної спільноти води Хаджибейського лиману [12], акваторії острова Зміїний Чорного моря [11] та прибережної частини Одеської затоки подібні між собою. Різниця для цих акваторій більш виражена у кількісному вимірі ніж у таксономічному і проявляється вже на рівні відділів.

В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу в прибережних водах острова Зміїний визначено близько 3200 ОТО. Виявлені основні відділи домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Planctomycetes, Tenericutes, Fusobacteria, Firmicutes і кандидатні відділи некультивованих представників прокаріот: SR1, BD1-5, BH180-139, OP3, OD1, WS3, NPL-UPA2, SHA-109, SM2F11 та TM6. В результаті таксономічного аналізу ідентифіковано багато бактеріальних родин

Рис. 2.21. Біологічна різноманітність прокаріот води акваторій острова Змійний, Хаджибейського лиману та Одеської затоки Чорного моря

і родів. Найбільш представленими родами серед досліджуваних зразків були *Marivita*, *Loktanella*, *Paracoccus*, *Pseudoalteromonas*, *Vibrio*, *Coralimargarita*, *Acholeplasma*, *Pseudomonas*, *Phaeobacter*, *Neptunomonas*, *Allivibrio*, *Oceaniserpentilla*, *Oceanospirillum*, *Robiginitalea*, *Acinetobacter*, *Haliea*.

Результати досліджень показують, що мікробні спільноти причорноморських Сухого, Дністровського та Хаджибейського лиманів різноманітні та численні. Склад домінуючих відділів (філіумів) у воді Дністровського, Сухого та Хаджибейського лиманів відрізняється. У Хаджибейском лимані переважали представники відділів *Proteobacteria*, де *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* і *Betaproteobacteria* були найбільш представленими класами. Аналогічні результати показані нами для води в районі острова Змійний [11], де було відзначено таке ж співвідношення домінуючих філіумів та його класів. Розподіл домінуючих відділів та класів у Хаджибейському лимані дуже схожий з результатами досліджень Саргасового моря [43], а також лиману

Changjiang у Китаї [22] з однією лише різницею, що там найбільш представленими були класи Beta- і Gammaproteobacteria. Незважаючи на низьку солоність Хаджибейський лиман все ж таки характеризується переважанням класу Alphaproteobacteria, у той час як у прісних водоймах переважають Betaproteobacteria.

Сухий та Дністровський лимани характеризувались переважанням представників відділу Cyanobacteria. Ці мікроорганізми зазвичай домінують у прісноводних водоймах. Вважається, що потепління клімату призводить до збільшення їх чисельності у водосховищах Європи [35]. Антропогенний вплив також може бути одним із факторів, що впливає на збільшення популяцій Cyanobacteria у морському середовищі.

Представники відділу Bacteroidetes виявлені у всіх трьох лиманах приблизно в рівних кількостях з домінуючим родом Flavobacteria. У водних середовищах деякі представники Bacteroidetes зазвичай живуть у симбіозі з водоростями. Аналогічний розподіл Bacteroidetes та його домінуючого роду Flavobacteria було виявлено при вивченні Саргасового моря [43]. На відміну від наших результатів у Саргасовому морі також спостерігали високий вміст бактерій роду Bacteroides, які об'єднані в один відділ CFB (Cytophaga, Flavobacterium, Bacteroides). У пробах лиманів представників Bacteroides не виявлено.

Зразки всіх трьох лиманів характеризувалися відносно високим вмістом представників Planctomycetes. Цей відділ включає відомих анаеробних аміак-окиснюючих бактерій (Annamoxbacteria), які частіше зустрічаються в осадових пробах, ніж як планктонні форми в поверхневих водах. Ці дані співпадають із попередніми дослідженнями Чорного моря, проведеними Kirkpatrick et al. [28] та Fuchsman et al. [23]. Представники Planctomycetes також були виявлені у воді біля острова Зміїний [11], однак у меншій кількості.

Члени класу Spartobacteria також виявились поширеними серед усіх досліджуваних проб. Ці бактерії відносяться до відділу Verrucomicrobia і є одним з найчисленніших представників у ґрунтовому середовищі [10]. Їх важко культивувати і, як наслідок, вони слабо представлені у базах даних. Verrucomicrobiae переважали у пробах осадів у лимані Changjiang [22]. Незважаючи на

це, нещодавно було зазначено, що ці мікроорганізми численні і у водній товщі морських водойм [23].

Більшість виявлених бактерій є типовими мешканцями морських середовищ, проте для близько 2.5% членів мікробних популяцій досліджуваних лиманів, позначених як “Others”, жодних родичів не встановлено. Ця група включає представників, про яких існує дуже мало інформації або вона зовсім відсутня в референсній базі даних Greengenes (<http://greengenes.secondgenome.com>). Можливо, використання іншої референсної бази, такої як Silva, допоможе проідентифікувати частину морських мікроорганізмів, що потрапили в цю групу, оскільки Silva спеціалізується на генних послідовностях морських зразків 16S rRNA, оскільки Greengenes зібрана з інформації інших баз даних і включає достатній набір послідовностей для повнішого філогенетичного аналізу [32].

Відмінності в прокаріотних популяціях між лиманами Хаджибей, Сухий та Дністровський були показані шляхом побудови UPGMA дерева та аналізом бета-різноманітності. Ймовірно, солоність є одним з головних факторів у бактеріальній різноманітності водойм [40]. У нашому дослідженні показано, що зразок Хаджибейського лиману з низьким показником солоності (5.5‰) кластеризується окремо від інших лиманів з вищим (Sukh - 10.0‰, Dnst 13.0‰) показником солоності [46]. Важливими факторами, що впливають на біологічну різноманітність мікроорганізмів, також може бути зв'язок з морем, надходження прісної води з річок у лимани Sukh і Dnst та ізоляція лиману Хаджибей від Чорного моря.

Результати проведеного дослідження та метагеномний аналіз, дають комплексну інформацію про біологічну різноманітність мікроорганізмів у акваторіях острова Змейний і причорноморських лиманів. Встановлено, що більшість із певних груп бактерій є типовими представниками морського середовища. Багато з них слабо вивчені і ще не піддаються культивуванню. Отримані результати відповідають літературним даним за схожими морськими дослідженнями [17, 42] і надають більш широку інформацію про склад і чисельність морської мікробіоти в порівнянні з класичними мікробіологічними методами. Проведений метаге-

номний 16S рРНК аналіз дозволив оцінити багату таксономічну різноманітність прокаріот поверхневих вод у досліджених районах акваторій острова Зміїний і причорноморських лиманів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Васильєва Т. В., Іваниця В. О., Васильєва Н. Ю., Бобрешова Н. С., Юргелайтіс Н. Г. Біологічні властивості тіонових бактерій північно-західної частини Чорного моря // Вісник ОНУ. – 2005. – Т. 10, № 3. – С. 123–135.
2. Васильєва Н. Ю., Крилова К. Д., Кристофферсен Й. Б., Дубровіна О. А., Іваниця В. О. Мікробна різноманітність прибережних вод Одеської затоки Чорного моря // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 4. – С. 63–75.
3. Воробьева Л. И. Археи. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 447 с.
4. Іваниця В. О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. К., 1996. – 47 с.
5. Крисс А. Е., Мишустина И. Е., Мицкевич И. Н., Земцова Э. В. Микробное население Мирового океана. – М.: АН СССР, 1964. – 300 с.
6. Лісютін Г. В., Бухтіяров А. Є., Білоіваненко С. О., Пономарьова Л. П., Гудзенко Т. В., Іваниця В. О. Нафтове забруднення і гетеротрофна мікробіота акваторії острова зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2009. – № 1. – С. 88–94.
7. Цыбань А. В. Бактерионейстон и бактериоплактон в прибрежной зоне Черного моря – К.: Наукова думка, 1970. – 272 с.
8. Acinas S. G., Klepac-Ceraj V., Hunt D. E., Pharino C., Ceraj I., Distel D. L., Polz M. F. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community // Nature. – 2004. – V. 430. – P. 551–554.
9. Berg C., Listmann L., Vandieken V., Vogts A., Jurgens K. Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea // Front. Microbiol. – 2015. – V. 15. – P. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2014.00786.

10. Bergmann G. T., Bates S. T., Eilers K. G., Lauber C. L., Caporaso J. G., Walters W., Knight R., Fierer N. The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities // *Soil Biol Biochem.* – 2011. – V. 43, № 7. – P. 1450–1455. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.03.012.
11. Bobrova O. E., Kristofferssen J., Ivanytsia V. O. Metagenome 16S rRNA gene analysis of the Black Sea microbial diversity in the region of the Zmiinyi Island // *Microbiology & Biotechnology.* – 2015. – № 2. – P. 6–19.
12. Bobrova O., Kristoffersen J. B., Oulas A., Ivanytsia V. Metagenomic 16s rRNA investigation of microbial communities in the Black Sea estuaries in South-West of Ukraine // *Acta Biochim Pol.* – 2016. – V. 63, № 2. – P. 315–319.
13. Caporaso J. G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F. D., Costello E. K., Fierer N. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature Methods.* – 2010. – V. 7. – P. 335–336.
14. Caporaso J. G., Lauber C. L., Walters W. A., Berg-Lyons D., Huntley J., Fierer N., Owens S. M., Betley J., Fraser L., Bauer M. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms // *The ISME Journal.* – 2012. – V. 6. – P. 1621–1624.
15. Costantino V., Hiep V. T., Lee J. K. Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – V. 69, № 11. – P. 6481–6488. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003>.
16. Cottrell M. T., Mannino A., Kirchman D. L. Aerobic Anoxygenic Phototrophic Bacteria in the Mid-Atlantic Bight and the North Pacific Gyre // *Applied Environmental Microbiology.* – 2006. – V. 72, № 1. – P. 557–564. doi: 10.1128/AEM.72.1.557-564.2006.
17. Davis J. P., Youssef N. H., Elshahed M. S. Assessment of the Diversity, Abundance and Ecological Distribution of Members of Candidate Division SR1 Reveals a High Level of Phylogenetic Diversity but Limited Morphotypic Diversity // *Applied and*

- Environmental Microbiology. – 2009. – V. 75, № 12. – P. 4139–4148. doi: 10.1128/AEM.00137-09.
18. DeLong E. F., Taylor T. L., Marsh L. T., Preston C. M. Visualization and Enumeration of Marine Planktonic Archaea and Bacteria by Using Polyribonucleotide Probes and Fluorescent In Situ Hybridization // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – V. 65. – P. 5554–5563.
 19. DeLong E. F., Karl D. M. Genomic perspectives in microbial oceanography // *Nature*. – 2005. – V. 437. – P. 336–342.
 20. Gilbert J., Jansson J., Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations // *BMC Biology*. – 2014. – V. 12. – P. 1–4. doi:10.1186/s12915-014-0069-1.
 21. Handelsman J., Liles M., Mann D., Riesenfeld C., Goodman R. M. Cloning the metagenome: Culture-independent Access to the Diversity and Functions of the Uncultivated Microbial World // *Methods in Microbiology*. – 2002. – V. 33. – P. 240–252.
 22. Feng B., Li X., Wang J., Hu Z., Meng H., Xiang L., Quan Z. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2009. – V. 70, № 2. – P. 236–248. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00772.x>.
 23. Freitas S., Hatosy S., Fuhrman J. A., Huse S. M., Welch D. B., Sogin M. L., Martiny A. C. Global distribution and diversity of marine Verrucomicrobia // *ISME J.* – 2012. – V. 6, № 8. – P. 1499–1505.
 24. Fuchsman C. A., Kirkpatrick J. B., Brazelton W. J., Murray J. W., Staley J. T. Metabolic strategies of free-living and aggregate-associated bacterial communities inferred from biologic and chemical profiles in the Black Sea suboxic zone // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2011. – V. 78, № 3. – P. 586–603. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01189.x>.
 25. Fuchsman C. A., Staley J. T., Oakley B. B., Kirkpatrick J. B., Murray J. W. Free-living and aggregate-associated Planctomycetes in the Black Sea // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2012. – V. 80, № 2. – P. 402–416. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01306.x>.

26. Kantor R. S., Wrighton K. C., Handley K. M., Sharon I., Hug L. A., Castelle C. J. et al. Small Genomes and Sparse Metabolisms of Sediment-Associated Bacteria from Four Candidate Phyla // *mBio*. – 2013. – V. 4, № 5. – P. 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00708-13>.
27. Kelly K. M., Chistoserdov A. Y. Phylogenetic analysis of the succession of bacterial communities in the Great South Bay (Long Island) // *FEMS Microbiology Ecology*. – V. 35, № 1. – 2001. – P. 85–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2001.tb00791.x>.
28. Kirkpatrick J., Oakley B., Fuchsman C., Srinivasan S., Staley J. T., Murray J. W. Diversity and Distribution of Planctomycetes and Related Bacteria in the Suboxic Zone of the Black Sea // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72, № 4. – P. 3079–3083. doi: 10.1128/AEM.72.4.3079-3083.2006.
29. Kopf A., Bicak M., Kottmann R., Schnetzer J., Kostadinov I., Lehmann K. et al. The ocean sampling day consortium // *GigaScience*. – 2015. – V. 4, № 1. – P. 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13742-015-0066-5>.
30. Kozich J. J., Westcott S. L., Baxter N. T., Highlander S. K., Schloss P. D. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2013. – V. 79, № 17. – P. 5112–5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13.
31. Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G., Kjeldsen K. U., Lever M. A., Steen A. D. et al. Predominant Archaea in marine sediments degrade detrital proteins // *Nature*. – 2013. – Vol. 496. – P. 215–218. doi: 10.1038/nature12033.
32. Navas-Molina J., Peralta-Sanchez M., Gonzales A., McMurdie P. J., Vazquez-Baeza Y., Xu Z. et al. Advancing Our Understanding of the Human Microbiome Using QIIME // *Methods in Enzymology*. – 2013. – V. 531. – P. 371–444.
33. Nilakanta H., Drews K. L., Firrell S., Foulkes M. A., Jablonski K. A. A review of software for analyzing molecular sequences // *BMC Research Notes*. – 2014. – V. 7. – P. 830–839.

34. Oulas A., Pavloudi C., Polymenakou P, Pavlopoulos G., Papanikolaou N., Kotoulas G. et al. Metagenomics: Tools and Insights for Analyzing Next-Generation Sequencing Data Derived from Biodiversity Studies // *Bioinformatics and Biology Insights*. – 2015. – V. 9. – P. 75–88.
35. Pitois F., Thoraval I., Baurès E., Thomas O. Geographical Patterns in Cyanobacteria Distribution: Climate Influence at Regional Scale // *Toxins*. – 2014. – V. 6, № 2. – P. 509–522. doi: 10.3390/toxins6020509.
36. Pommier T., Canback L., Riemann N., Bostrom K. H., Simu K., Lundberg P. et al. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton // *Mol Ecol*. – 2007. – V. 16. – P. 867–880.
37. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – V. 41. – P. 590–596. doi:10.1093/nar/gks1219.
38. Sala M. M., Terrado R., Lovejoy C., Unrein F., Pedros-Alio C. Metabolic diversity of heterotrophic bacterioplankton over winter and spring in the coastal Arctic Ocean // *Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 10, № 4. – P. 942–949. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01513.x.
39. Schauer R., Bienhold C., Ramette A., Harder J. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean // *The ISME Journal*. – 2010. – V. 4. – P. 159–170.
40. Sun T., Yang Z. F., Shen Z. Y., Zhao R. Environmental flows for the Yangtze Estuary based on salinity objectives // *Commun Nonlinear Sci Numer Simul*. – 2009. – V. 14, № 3. – P. 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.cnsns.2007.10.006>.
41. Tsyban A. V., Panov G. V., Ivanitsa V. A., Khudchenko G. V. Taxonomic Composition of heterotrophic bacteria // In *Results of the Third Joint US-USSR Bering and Chukchi Seas Expedition (BERPAC)*, HUMMER, 1988. – Nagel P.A. (ed.) US Fish and Wildlife Service, Washington, DC, – 1992. – P. 87–90.

42. Urios L., Intertaglia L., Lesongeur F., Lebaron P. *Haliea rubra* sp. nov., a member of the Gammaproteobacteria from the Mediterranean Sea // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – V. 58, № 5. – P. 1233–1237.
43. Venter J. C., Remington K., Heidelberg J. F., Halpern A. L., Rusch D., Eisen J. A. et al. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea // Science. – 2004. – V. 304. – P. 66–74. doi: 10.1126/science.1093857.
44. Vetriani C., Tran H. V., Kerkhof L. K. Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – V. 69, № 11. – P. 6481–6488. doi: 10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003.
45. Vieira R., Gonzales A. M., Cardoso A. M., Oliveira D. N., Albano R. M., Clementino M. M. et al. Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro // Environmental Microbiology. – 2008. – V. 10, № 1. – P. 189–199. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01443.x>
46. Zaycev J., Aleksandrov B., Minicheva G. Eastern-western part of the Black Sea: biology and ecology // Naukova dumka. – 2006. – V. 1. – P. 351–426.
47. Zhang J., Kobert K., Fluori T., Stamatakis A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-end read merger // Bioinformatics. – 2013. – V. 30, № 5. – P. 614–620. doi: 10.1093/bioinformatics/btt593.