

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. Ломоносова
Биологический факультет**

на правах рукописи

СПИРИДОНОВА ЕЛИЗАВЕТА МИХАЙЛОВНА

**Выявление и филогенетический анализ генов, кодирующих большую
субъединицу рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы
формы I, у бактерий различных таксономических групп**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва, 2006 г.

Работа выполнена на базе ЦКП Центра «Биоинженерия» РАН

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор
Ивановский Р.Н.

Научный консультант кандидат биологических наук
Турова Т.П.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Бонч-Осмоловская Е. А.
доктор биологических наук
Кочиева Е. З.

Ведущая организация **Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского**

Защита состоится 24 октября 2006 года в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан ____ сентября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Пискунова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Первичная продукция органического углерода в биосфере основана на ассимиляции CO_2 автотрофными организмами. В процессе эволюции у разных групп автотрофов выработались различные механизмы фиксации CO_2 , наиболее распространенным из которых является восстановительный рибулозобисфосфатный цикл (цикл Кальвина). Ключевым ферментом автотрофной фиксации CO_2 в цикле Кальвина является рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РБФК, КФ 4.1.1.39), по структурным и функциональным свойствам разделяемая на четыре формы. Наиболее распространенной является форма I, которая состоит из больших и малых субъединиц, кодируемых, соответственно, генами *cbbL* и *cbbS*. В свою очередь, РБФК формы I подразделяют на два типа: так называемые «зеленый» (варианты IA и IB) и «красный» (варианты IC и ID). РБФК формы II, кодируемая геном *cbbM*, встречается гораздо реже и состоит только из больших субъединиц. Форма III недавно обнаружена у архей, к форме IV относят РБФК-подобные белки. В то время, как структурные и биохимические свойства РБФК обстоятельно исследованы классическими методами, данные о происхождении и эволюции этого фермента чрезвычайно ограничены.

Наиболее эффективные способы исследования происхождения и эволюции РБФК основаны на молекулярно-биологических методах, позволяющих проводить сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих этот белок, у различных групп прокариот, принадлежащим к удаленным друг от друга эволюционным ветвям. Филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов, кодирующих РБФК, широко применяется в таксономии растений и водорослей (Clegg, 1993; Freshwater et al., 1994). Сравнение филогенетических схем (деревьев), построенных на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих РБФК, традиционного анализа генов, кодирующих 16S рРНК, а также, в некоторых случаях, анализа и других структурных генов, позволяет выявить особенности эволюции и функционирования генов, кодирующих РБФК, у различных прокариот.

Несмотря на большую экологическую и практическую значимость процесса фиксации CO_2 , до настоящего времени остаются малоизученными вопросы, связанные с оценкой биоразнообразия автотрофных бактерий в природных сообществах.

В этой связи разработка методов выявления и филогенетической характеристики генов, кодирующих РБФК у различных прокариот, представляется весьма актуальной.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы заключалась в разработке универсальной системы олигонуклеотидных праймеров, позволяющей амплифицировать фрагменты генов, кодирующих большую субъединицу РБФК формы I бактерий, и ее применении для анализа разнообразия исследуемых генов у фото- и хемотрофных бактерий, различающихся по экологическим, физиологическим особенностям и таксономическому положению.

Конкретные задачи исследования состояли в следующем:

1. Конструирование универсальной системы олигонуклеотидных праймеров, позволяющей амплифицировать фрагменты генов, кодирующих большую субъединицу РБФК формы I, у максимально широкого спектра бактерий.
2. Проверка выбранной системы праймеров на препаратах ДНК, выделенных из бактерий, для которых ранее была продемонстрирована способность к фиксации CO₂ через цикл Кальвина и известна первичная структура генов, кодирующих РБФК.
3. Подбор и оптимизация условий ПЦР для амплификации выбранных фрагментов генов, кодирующих РБФК, и применение разработанной системы праймеров и протокола проведения реакции для исследования модельной группы бактерий, использующих восстановленные соединения серы в качестве доноров электронов. Проведение филогенетического анализа полученных последовательностей.
4. Сопоставление филогенетических деревьев, построенных на основе анализа последовательностей генов, кодирующих РБФК и 16S рРНК.
5. Проверка применимости разработанной системы праймеров для исследования микробных сообществ.

Научная новизна и практическая значимость работы. Разработана универсальная система праймеров, позволяющая амплифицировать фрагменты генов *cbbL* у максимально широкого спектра бактерий.

Впервые выявлены и секвенированы гены *cbbL* фототрофных зеленых несерных бактерий рода *Oscillochloris*, а также ряда хемотрофных серуоокисляющих бактерий, принадлежащих к родам *Thiobacillus*, *Thioalkalivibrio*, *Thioalkalispira*, *Thioalkalimicrobium*, *Thiomicrospira* и *Thioclava*, и проведен их филогенетический анализ.

Предложена схема эволюции генов, кодирующих РБФК, у представителей родов *Thioalkalimicrobium* и *Thiomicrospira*.

Предположено существование нового варианта «красного» типа РБФК формы I у бактерий *Oscillochloris trichoides* и *Sulfobacillus acidophilus*.

Проведен комплексный анализ разнообразия симбиотического бактериального сообщества, обитающего в жабрах глубоководных двустворчатых моллюсков *Bathymodiolus azoricus*. Показано, что разработанная система праймеров может использоваться при проведении исследований биоразнообразия автотрофных микроорганизмов в различных природных сообществах. Показано, что результаты анализа функциональных генов позволяют существенно дополнять выводы, получаемые при проведении анализа генов, кодирующих 16S рРНК, и получать более полную информацию о составе прокариотных природных сообществ.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (Badajoz, 2005), XII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва, 2005), Всероссийской Молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2005), Всероссийском симпозиуме «Автотрофные

микроорганизмы» (Москва, 2005), 11th International Symposium on Microbial Ecology (Vienna, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 статей, 5 тезисов в сборниках работ российских и зарубежных конференций, 2 статьи приняты в печать.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 127 страницах машинописного текста и включают 31 рисунок и 5 таблиц. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Экспериментальная часть», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы», который содержит 11 отечественных и 189 иностранных наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 28 штаммов бактерий, использующих восстановленные соединения серы в качестве доноров электронов, из коллекций кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова и Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Образцы жаберной ткани двустворчатых моллюсков *Bathymodiolus azoricus* были предоставлены Институтом микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН.

Выбор праймеров. Построение консенсусных последовательностей по результатам выравнивания нуклеотидных последовательностей генов *cbbL* и поиск в них консервативных участков осуществляли с помощью программы Consens (Марусина, неопубликованные данные).

Выделение ДНК. Для выделения ДНК применяли модифицированную методику щелочной экстракции (Birnboim & Doly, 1979) и Wizard-технологии фирмы Promega (США).

ПЦР. Разработанные ранее системы праймеров и протоколы проведения реакции были использованы для амплификации фрагментов генов, кодирующих 16S рРНК (Lane, 1991) и мембранную метанмонооксигеназу (Holmes et al., 1995).

Амплификацию фрагментов генов *cbbL* «зеленого» типа проводили с использованием сконструированных праймеров:

RubIgF 5'-GAYTTCACCAARGAYGAYGA-3`;

RubIgR 5'-TCRAACTTGATYTCYTTCCA-3`.

Объем амплификационной смеси составлял 25 мкл и имел следующий состав: буфер ДНК полимеразы (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8, 4 мМ MgCl₂); по 6.25 нмоль каждого из dNTP, 25 нг ДНК-матрицы; по 7.8 пмоль каждого праймера и 1.5 ед. ДНК полимеразы BioTaq (Диалат ЛТД, Россия). Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл - 94°C x 3 мин, 58°C x 1 мин, 72°C x 1 мин; последующие 7 циклов - 94°C x 30 с, 58°C x 20 с, 72°C x 45 с; последние 28 циклов - 94°C x 30 с, 45°C x 30 с, 72°C x 30 с; завершающий цикл - 72°C x 7 мин.

Амплификацию фрагментов генов *cbbL* «красного» типа проводили с использованием сконструированных праймеров:

RubIrF 5'-GCVACCTGGACSGTSGTGTGG-3`;

RubIrR 5'-TCGCCYTCSAGCTTGCCSAC-3`;

RubIr892R 5'-TCTTCTGSCGSGTRTAGGTSSMRTGRCC-3`.

Для пары праймеров **RubIrF-RubIrR** объем амплификационной смеси составлял 25 мкл и имел следующий состав: буфер ДНК полимеразы (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8.8,

4 mM MgCl₂); по 6.25 нмоль каждого из dNTP, 17.5 нг ДНК-матрицы; по 3.9 пмоль каждого праймера и 1.5 ед. ДНК полимеразы BioTaq. Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл - 94°C x 3 мин, 66°C x 1 мин, 72°C x 1 мин; последующие 7 циклов - 94°C x 30 с, 66°C x 20 с, 72°C x 45 с; последние 28 циклов - 94°C x 30 с, 55°C x 30 с, 72°C x 30 с; завершающий цикл - 72°C x 7 мин. Для пары праймеров **RubIrF-RubIr892R** объем амплификационной смеси составлял 25 мкл и имел следующий состав: буфер ДНК полимеразы (17 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM трис-HCl, pH 8.8, 2 mM MgCl₂); по 6.25 нмоль каждого из dNTP, 17.5 нг ДНК-матрицы; по 3.9 пмоль каждого праймера и 1 ед. ДНК полимеразы BioTaq. Температурно-временной профиль ПЦР: первый цикл - 94°C x 3 мин, 60°C x 30 с, 72°C x 30 с; последующие 35 циклов - 94°C x 30 с, 60°C x 30 с, 72°C x 30 с; завершающий цикл - 72°C x 7 мин.

Очистка и клонирование ПЦР-фрагментов. Продукты ПЦР очищали с применением набора реактивов «Wizard PCRPreps» (Promega, США). Клонирование выделенных ПЦР-фрагментов проводили с использованием набора реактивов «pGEM-T Easy Vector System» (Promega, США) в компетентных клетках *Escherichia coli* DH5 α . Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили при помощи набора реактивов Wizard MiniPrep (Promega, США).

Секвенирование ДНК. Секвенирование проводили с использованием набора реактивов «Silver Sequence™ DNA Sequencing System» (Promega, США) согласно рекомендациям производителя, с незначительными модификациями. Клонированные фрагменты исследуемых генов секвенировали с универсальных плазмидных праймеров M13F, M13R26, SP6 и T7 (Sambrook et al., 1989). Секвенирование ПЦР-фрагментов исследуемых генов проводили с использованием соответствующих амплифицирующих и секвенирующих праймеров.

Филогенетический анализ. Первичный сравнительный анализ секвенированных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Редактирование последовательностей проводили с помощью редактора BioEdit (<http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTAL W v 1.75 (Thompson et al., 1994). Построение филогенетических деревьев проводили с использованием различных алгоритмов, реализованных в пакетах программ TREECON W (Van de Peer & De Wachter, 1994) и PHYLIP (Felsenstein, 1989). Расчет относительных частот использования кодонов (RSCU) и проведение анализа соответствия осуществляли с помощью пакета программ Codon W (<http://www.molbiol.ox.ac.uk/cu>). Уровни синонимичных (dS) и несинонимичных (dN) замен рассчитывали при помощи пакета программ PAML (Yang, 2000).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Конструирование системы олигонуклеотидных праймеров. Был проведен компьютерный анализ всех имевшихся в электронных базах данных последовательностей генов *cbbL*. По результатам анализа степени консервативности различных районов консенсусных последовательностей для генов *cbbL* «зеленого» и «красного» типов были выбраны несколько участков, на основе которых была сконструирована система праймеров для амплификации фрагментов исследуемых генов длиной приблизительно 800 пар нуклеотидов. В процессе работы разрабатываемая праймерная система подвергалась совершенствованию по мере появления новых последовательностей генов *cbbL*. Последовательности разработанных праймеров указаны в разделе «Объекты и методы исследования».

Проверка разработанной системы праймеров проводилась на препаратах ДНК бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* TFY и *Rhodobacter sphaeroides* 2R. У исследуемых штаммов были выявлены фрагменты ожидаемой длины, последовательности которых были в значительной степени гомологичны (90.1-98.9%) генам *cbbL* штаммов соответствующих видов, ранее депонированным в базу данных GenBank, что свидетельствовало об эффективности разработанной системы праймеров.

С целью уменьшения количества неспецифических продуктов ПЦР и получения нужного фрагмента в повышенной концентрации были подобраны и оптимизированы условия проведения ПЦР для амплификации участков генов *cbbL* и «зеленого» и «красного» типов по методу Тагучи (Cobb, 1997). Конечные протоколы проведения реакций приведены в разделе «Объекты и методы исследования».

2. Филогенетический анализ генов *cbbL* у представителей различных таксонов прокариот. Эффективность разработанной нами системы праймеров была проверена на модельной группе бактерий, способных использовать восстановленные соединения серы в качестве доноров электронов. К ней относятся фото- и хемотрофные, авто- и гетеротрофные микроорганизмы, принадлежащие к различным, не родственным в систематическом отношении, подгруппам. Большинство автотрофных представителей этой группы ассимилируют CO₂ через цикл Кальвина. Однако, данные о первичных последовательностях генов, кодирующих РБФК этой группы прокариот, ограничены.

2.1. Выявление, секвенирование и филогенетический анализ генов *cbbL* у фотолитоавтотрофных бактерий семейства *Oscillochloridaceae*. Бактерии семейства *Oscillochloridaceae* являются единственными представителями филогенетической линии аноксигенных нитчатых фототрофных бактерий (АНФБ) (Рис. 1а), для которых ранее было показано наличие активности РБФК (Ivanovsky et al., 1999). У трех представителей рода *Oscillochloris* нами впервые были выявлены и секвенированы фрагменты генов *cbbL* «красного» типа. Также был проведен анализ последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК.

Несмотря на то, что исследуемые штаммы рода *Oscillochloris* были выделены из географически отдаленных пресноводных источников, филогенетически они оказались

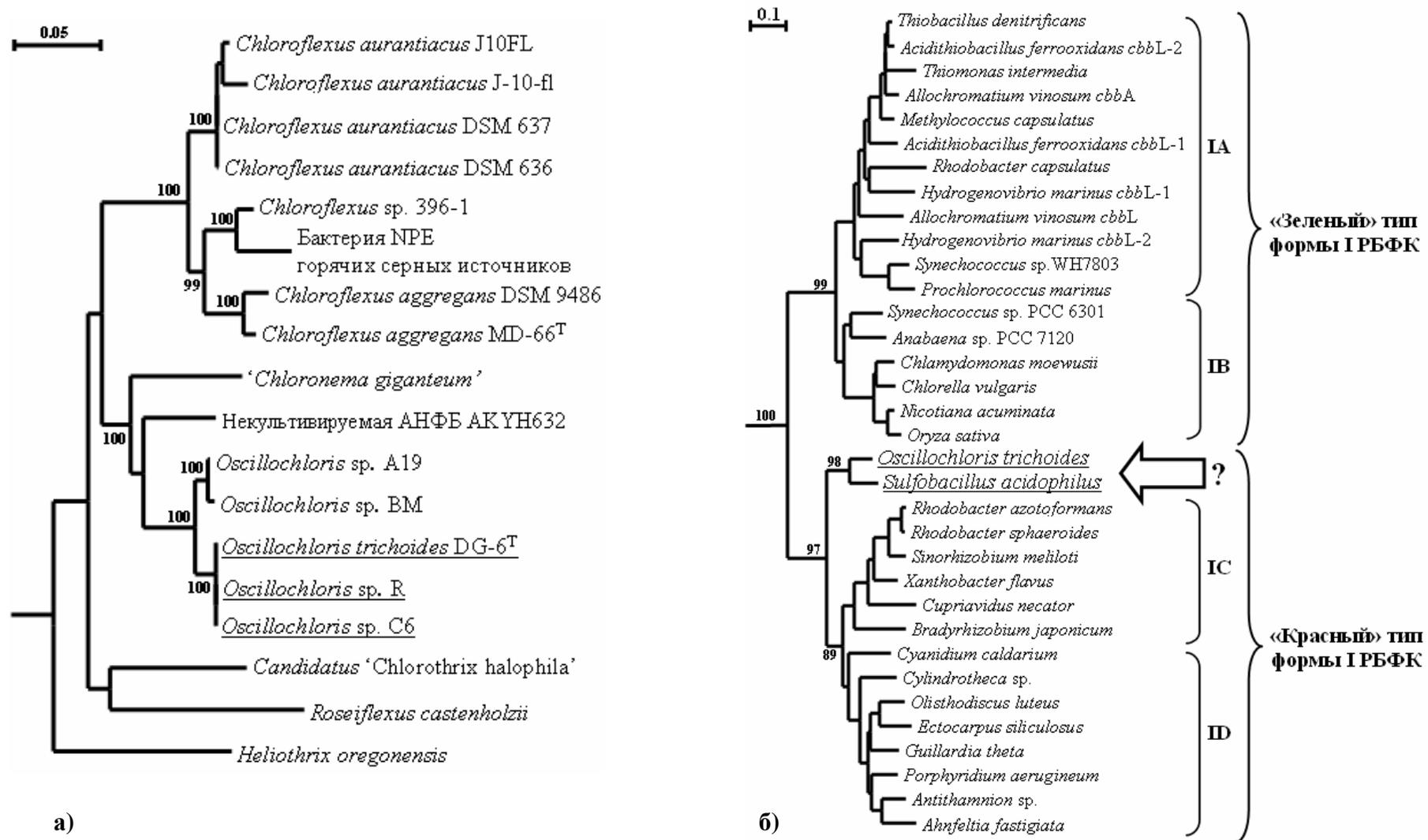


Рис. 1. Филогенетические деревья, построенные с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

а) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (больше 95%). Подчеркнуты последовательности исследованных бактерий.

б) транскрибированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев на основании bootstrap-анализа.

Последовательности генов *cbbL*, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

идентичными, согласно результатам анализа последовательностей генов, кодирующих как 16S рРНК, так и РБФК. Это не противоречит ранее полученным данным фенотипического анализа, включая детальное исследование углеродного метаболизма, которые также не выявили заметных различий между этими штаммами (Kerpen et al., 2000; Берг и др., 2005). Таким образом, на основании всего комплекса данных можно заключить, что все исследованные штаммы являются представителями одного вида *Osc. trichoides*.

Анализ генов *cbbL* свидетельствовал об особом положении представителей рода *Oscillochloris*, которые с высоким уровнем bootstrap-поддержки (97%) образовывали на филогенетическом дереве отдельную ветвь, значительно удаленную от вариантов IC и ID генов *cbbL* «красного» типа (уровни гомологии аминокислотных последовательностей 73.1-85.3% и 74.0-79.5%, соответственно). В то же время, по данным анализа генов *cbbL*, единственной близкой к исследуемым АНФБ оказалась грамположительная факультативно хемоавтотрофная бактерия *Sulfobacillus acidophilus* (уровень гомологии аминокислотных последовательностей 89.2%), которая образовывала с исследуемыми штаммами монофилетический кластер с высоким уровнем bootstrap-поддержки (98%) (Рис. 1б).

Обособленное положение кластера последовательностей *cbbL* *Osc. trichoides*/*S. acidophilus*, возможно, свидетельствует о существовании нового варианта «красного» типа РБФК формы I. Вопрос о том, является ли обнаруженное сходство последовательностей генов *cbbL* между видами *Osc. trichoides* и *S. acidophilus* результатом вертикальной эволюции или же результатом латерального переноса генов, пока остается открытым.

2.2. Выявление, секвенирование и филогенетический анализ генов *cbbL* у хемолитоавтотрофных бактерий.

2.2.1. р. *Thiobacillus*. Недавно из низкотемпературных сероводородных источников Хойто-Гол (Восточные Саяны) были выделены штаммы алкалитолерантных облигатно автотрофных серуокисляющих бактерий (СОБ). Согласно результатам анализа генов, кодирующих 16S рРНК, эти изоляты были отнесены к β-протеобактериям рода *Thiobacillus*, в монофилетическом кластере которого они составляли отдельную ветвь (Рис. 2а).

На основании фенотипических и генотипических различий было предложено выделить изолированные штаммы в новый вид *Thiobacillus sajanensis* (Дульцева и др., 2006). К этому моменту к роду *Thiobacillus* относили только три вида: *T. thioparus*, *T. aquaesulis* и *T. denitrificans*.

Все исследованные представители рода *Thiobacillus* ассимилируют CO₂ через цикл Кальвина. Была известна первичная структура генов, кодирующих РБФК, только для одного представителя рода *Thiobacillus* – *T. denitrificans*. С помощью разработанной системы праймеров нами были выявлены гены *cbbL* «зеленого» типа у *T. thioparus* DSM 505^T, а также у штаммов 4HG^T и 1HG ‘*T. sajanensis*’, при этом оказалось, что последовательности генов *cbbL* исследованных штаммов ‘*T. sajanensis*’ были идентичными.

В отличие от дерева, основанного на анализе генов, кодирующих 16S рРНК, последовательности РБФК близкородственных представителей рода *Thiobacillus* не образуют

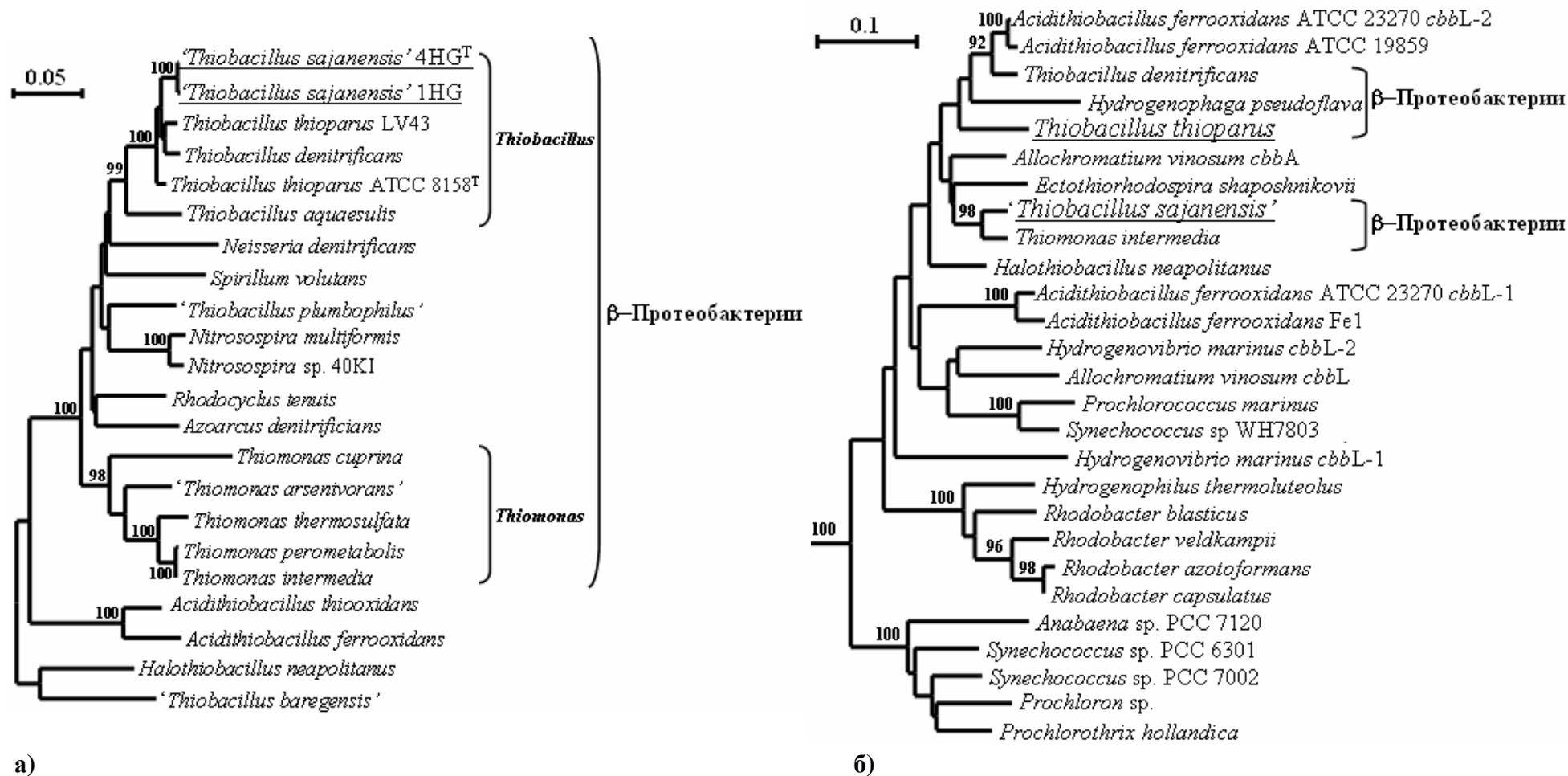


Рис. 2. Филогенетические деревья, построенные с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

а) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Последовательности исследованных бактерий подчеркнуты;

б) транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Последовательности генов *cbbL*, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (больше 90%).

монофилетического кластера. Более того, их ближайшими соседями на филогенетическом дереве, основанном на анализе транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*, оказались различные представители β - и γ -протеобактерий: *T. denitrificans* образует единый кластер с видом γ -протеобактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* с высоким уровнем сходства последовательностей (95.5-95.9% гомологии) и bootstrap-поддержки (92%), *T. thioparus* составляет отдельную ветвь с неустойчивым положением на дереве (уровень bootstrap-поддержки 31%), а '*T. sajanensis*' образует монофилетический кластер с представителем другого рода β -протеобактерий – *Thiomonas intermedia* – также с высоким уровнем сходства последовательностей (96.2% гомологии) и bootstrap-поддержки (98%) (Рис. 2б).

Таким образом, проведенный нами филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов *cbbL*, в таксономическом плане подтверждал необходимость выделения новых изолятов в отдельный вид '*T. sajanensis*', а в эволюционном плане свидетельствовал о возможном участии в эволюции генов, кодирующих РБФК у тиобацилл, процессов латерального переноса.

2.2.2. pp. *Thioalkalivibrio* и *Thioalkalispira*. В результате интенсивных микробиологических исследований содовых озер была обнаружена и охарактеризована новая группа галоалкалифильных облигатно автотрофных СОБ, основным отличием которых является способность к оптимальному росту в соленых щелочных растворах с pH 9–10.6. Эта группа к настоящему времени включает три рода, относящиеся к γ -протеобактериям: *Thioalkalimicrobium*, *Thioalkalivibrio* и *Thioalkalispira*.

Согласно результатам анализа последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК, род *Thioalkalivibrio* составляет единый филогенетический кластер, разделенный на 3 подгруппы (Sorokin et al., 2001; 2002; 2003; 2004; Banciu et al., 2004); *Thioalkalispira microaerophila* ALEN 1^T не является близким ни к одному из известных таксонов γ -протеобактерий и образует в этом подклассе новую глубокую ветвь (Sorokin et al., 2002) (Рис. 3а).

Хотя для представителей родов *Thioalkalivibrio* и *Thioalkalispira* было показано наличие активности РБФК (Sorokin et al., 2000; 2002), до сих пор оставались неизвестными как форма и структура фермента, так и последовательности детерминирующих его генов.

С использованием разработанной нами системы праймеров у типовых штаммов видов родов *Thioalkalivibrio* и *Thioalkalispira* были выявлены гены *cbbL* «зеленого» типа.

В результате анализа генов *cbbL* не было обнаружено близкого филогенетического родства между единственным видом рода *Thioalkalispira* и каким-либо видом, принадлежащим к роду *Thioalkalivibrio*, что подтверждает разделение этих двух типов галоалкалифильных СОБ на два различных рода, проведенное ранее на основании комплекса фенотипических и генотипических данных.

На деревьях, построенных по результатам анализа последовательностей генов *cbbL*, род *Thioalkalivibrio* не является монофилетичным, хотя его разделение на независимые

кластеры отчасти коррелирует с внутренней филогенетической дивергенцией, выявляемой по результатам анализа генов, кодирующих 16S рРНК (Рис. 3б,в)

Из сравнения результатов анализа генов, кодирующих 16S рРНК и РБФК формы I, следует, что наиболее обширная группа видов *Tv. versutus*, *Tv. jannaschii*, *Tv. nitratis* и *Tv. thiocyanoxidans* (кластер 1) объединяет безусловно родственные организмы, имеющие единое происхождение. Представители этой группы, несмотря на физиолого-биохимические различия, позволяющие разделить их на самостоятельные виды, имеют типичную для данного рода вибрионоподобную форму клеток с полярным жгутиком; большинство из них способны к росту в гиперсоленых условиях. Слабогалофильные виды *Tv. denitrificans* и *Tv. thiocyanodenitrificans* (кластер 3) с палочковидной формой клеток и способностью к денитрификации, относятся к отдельной филогенетической подгруппе, которая согласно результатам анализа последовательностей 16S рРНК, расположена на дереве ближе всего к точке ответвления всего кластера рода *Thioalkalivibrio* (Рис. 3а). Наибольшая степень генетической дивергенции этих видов относительно других представителей исследуемого рода также подтверждается и низким уровнем ДНК-ДНК гибридизации, не превышающей 20% (Sorokin et al., 2001; 2004). Согласно филогенетическому анализу генов *cbbL*, эта группа видов также значительно дивергировала от основной группы облигатно аэробных видов, причем межвидовое родство внутри кластера 3 прослеживается только при сравнении на уровне нуклеотидных последовательностей, а на дереве, основанном на анализе аминокислотных последовательностей, этот кластер распался на две независимые ветви.

Филогенетические взаимоотношения видов, входящих в кластер 2 (*Tv. nitratreducens* и *Tv. paradoxus*), особенно интересны. Согласно результатам анализа генов, кодирующих 16S рРНК, они составляют единую филогенетическую группу внутри исследуемого рода. Общность происхождения и филогенетическая обособленность этой группы видов подтверждаются также их высоким уровнем ДНК-ДНК гибридизации в сравнении с очень низким уровнем гибридизации с ДНК бактерий двух других групп, а также весьма необычной для рода *Thioalkalivibrio* морфологией клеток (оба вида имеют крупные, неподвижные, кокковидные клетки с крупными включениями серы) (Sorokin et al., 2002). Согласно результатам проведенного нами анализа как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей, гены *cbbL* этой группы видов также имеют общее происхождение и значительно дивергировали по сравнению с остальными видами исследуемого рода и, кроме того, эти два вида достоверно кластеризуются с пурпурной серной бактерией *Allochromatium vinosum*, являющейся представителем другого семейства γ -подкласса протеобактерий - *Chromatiaceae*. С высокой вероятностью, это свидетельствует об общности происхождения генов *cbbL* у этих различающихся по филогенетическому положению и физиолого-биохимическим особенностям микроорганизмов. Одним из возможных эволюционных механизмов в данном случае мог быть горизонтальный перенос генов, вклад которого в эволюцию семейства генов, кодирующих РБФК, предполагается весьма значительным (Delwiche & Palmer, 1996). Этот процесс, возможно, осуществлялся на уровне общего предка обоих видов *Thioalkalivibrio* и предшественника семейства *Chromatiaceae*, как

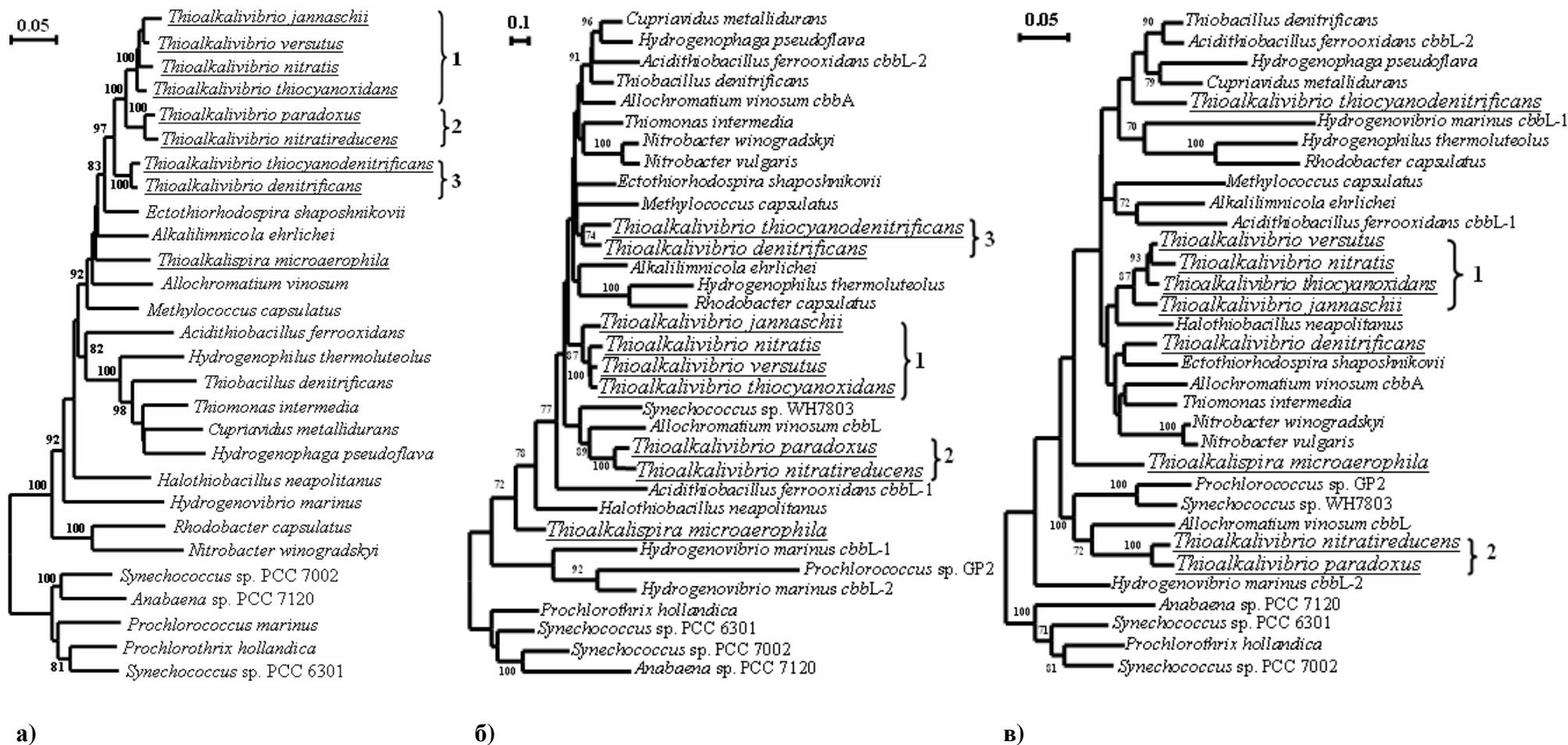


Рис. 3. Филогенетические деревья, построенные с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

а) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Последовательности исследованных бактерий подчеркнуты;

б) нуклеотидных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов;

в) транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 аминокислот. Последовательности генов *cbbL*, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

Цифрами показана достоверность ветвления 100 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (больше 70%).

это следует из относительно невысокого сходства последовательностей генов *cbbL* у этих организмов и *Alc. vinosum*.

Следует отметить, что оба данных вида *Thioalkalivibrio* морфологически очень напоминают *Allochromatium* и настолько сильно отличаются от других представителей рода *Thioalkalivibrio*, что один из них был назван «*paradoxus*». Данный случай – яркий пример из многих, накопившихся к настоящему времени, когда таксономическое положение бактерии, определяемое только на основе последовательностей 16S рРНК, не совпадает с комплексом других признаков. И хотя обычно преимущество отдается результатам анализа рибосомных генов, такой подход, по всей видимости, не совсем оправдан. В случае с парой *Tv. paradoxus*/*Tv. nitratireducens* наиболее естественным решением стало бы их выделение за пределы рода *Thioalkalivibrio* в самостоятельный род. В то же время, учитывая удивительное морфологическое сходство двух таких различных типов серозависимых автотрофов, как фототрофные *Allochromatium* и хемотрофные *Thioalkalivibrio*, можно предположить, что в процесс переноса генов между этими филогенетически отдаленными бактериями могли вовлекаться не только отдельные гены, такие как кодирующие РБФК, но и целые генетические блоки.

Признание возможности горизонтального переноса в процессе эволюции обширных блоков генетической информации может сильно осложнить создание естественной системы бактерий, из чего вытекает необходимость выработки новых подходов в таксономии. Использование дополнительных филогенетических данных, особенно касающихся генов, имеющих первостепенное значение для изучаемой группы, может в какой-то мере помочь прояснить сомнительные в эволюционном и таксономическом аспекте случаи.

2.2.3. pp. *Thioalkalimicrobium* и *Thiomicrospira*. Род *Thiomicrospira* включает облигатно хемолитоавтотрофных СОБ, выделенных из соленых, преимущественно морских, мест обитания и принадлежащих к γ -протеобактериям. Основными особенностями, отличающими род *Thiomicrospira* от остальных СОБ, являются толерантность к соли и высокие скорости роста (Brinkhoff et al., 2005).

Согласно результатам анализа генов, кодирующих 16S рРНК, род *Thiomicrospira* является гетерогенным и включает в свой состав по крайней мере две различные группы, кластеризующиеся либо с *Tms. pelophila*, либо с *Tms. crunogena* (Brinkhoff et al., 1999; Takai et al., 2004). Кроме того, род *Thiomicrospira* является частью более крупной группы близкородственных бактерий, названной нами группа «*Thiomicrospira*». Эта группа включает в себя галоалкалифильных СОБ рода *Thioalkalimicrobium* (Sorokin et al., 2001; 2002) и водородокисляющую бактерию рода *Hydrogenovibrio* (Nishihara et al., 1991), являющихся членами кластеров «*Tms. pelophila*» и «*Tms. crunogena*», соответственно (Рис. 4а).

Недавно было показано, что *Hydrogenovibrio marinus* обладает тремя наборами генов, кодирующих РБФК (два гена *cbbL* «зеленого» типа и один ген *cbbM*) (Yoshizawa et al., 2004). Проведенные нами исследования показали, что *Tms. kuenenii* и *Tms. crunogena* также имеют по три набора генов, кодирующих РБФК, тогда как *Tms. pelophila*, филогенетически обособленная от этой группы видов, имеет два набора генов, соответствующих генам *cbbL-2*

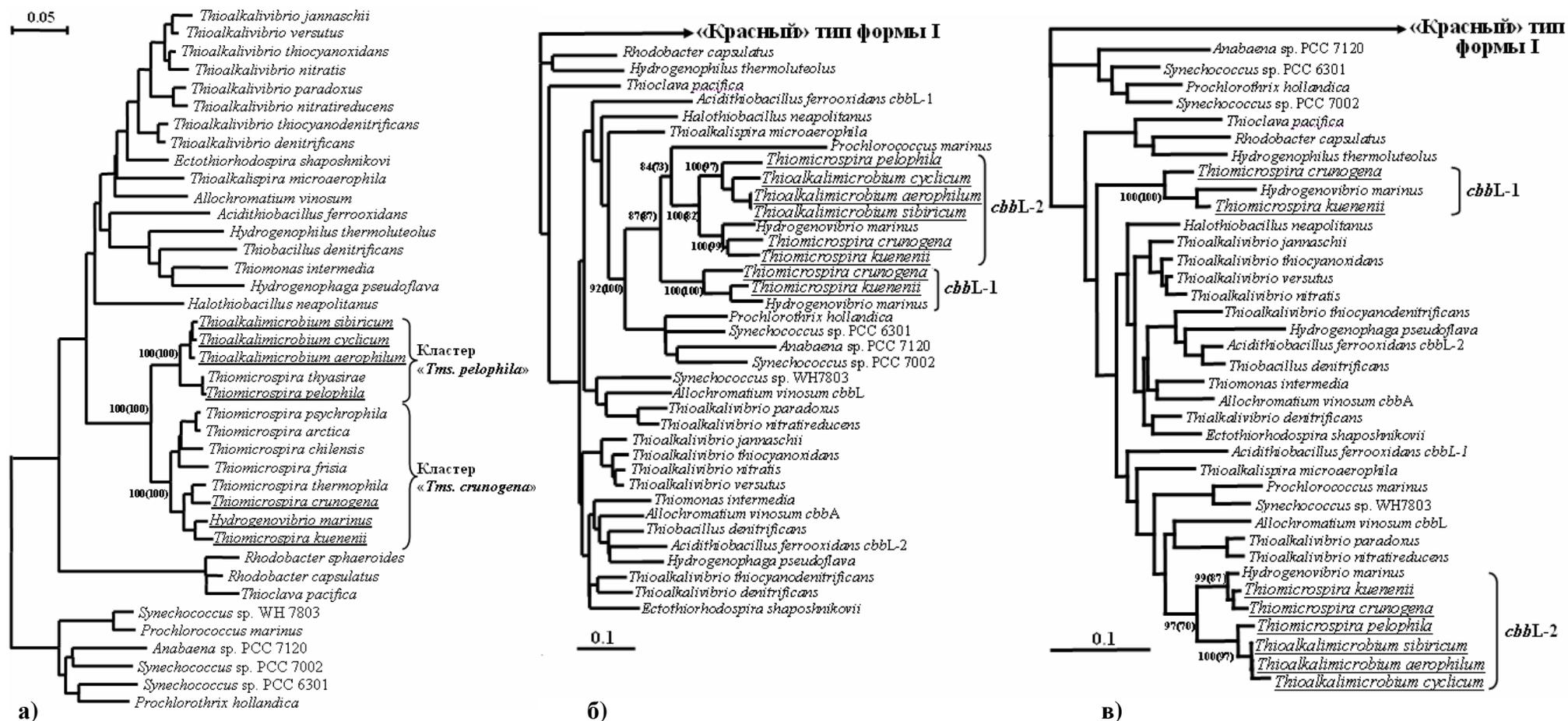


Рис. 4. Филогенетические деревья, построенные с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

а) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Последовательности исследованных бактерий подчеркнуты;

б) нуклеотидных последовательностей генов *cbbL*;

в) транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов/аминокислот. Последовательности генов *cbbL*, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (в скобках указаны значения для алгоритма maximum-parsimony).

и *cbbM* *H. marinus*. Представители рода *Thioalkalimicrobium* обладают только одним геном *cbbL*, соответствующим гену *cbbL-2* *H. marinus* (Рис. 4б,в; 5).

Как на нуклеотидном, так и на аминокислотном деревьях, последовательности *cbbL-2* *Tms. crunogena* и *Tms. kuenenii*, а также последовательности *cbbL* *Tms. pelophila* и трех видов рода *Thioalkalimicrobium* формировали единый кластер с высоким уровнем bootstrap-поддержки (100% и 97% для нуклеотидов и аминокислот, соответственно) с последовательностью *cbbL-2* *H. marinus*. Последовательности *cbbL-1* *Tms. crunogena* и *Tms. kuenenii* также формировали единый кластер с высоким уровнем bootstrap-поддержки (100% и для нуклеотидов, и для аминокислот) с последовательностью *cbbL-1* *H. marinus*.

Однако для группы «*Thiomicrospira*» в целом видно, что филогенетические деревья, построенные на основании сравнения нуклеотидных и аминокислотных последовательностей РБФК, отличаются по топологии и длине ветвей (Рис. 4б,в). На нуклеотидном дереве последовательности *cbbL-1* и *cbbL-2* группы «*Thiomicrospira*» формировали единую группу (с уровнем bootstrap-поддержки 87%), кластеризуясь с геном *rbcL* цианобактерии *Prochlorococcus marinus* (с уровнем bootstrap-поддержки 84%), с большой длиной ветви. Ближайшим соседом этого кластера является основной кластер генов *rbcL* цианобактерий *Prochlorothrix hollandica*, *Synechococcus* sp. PCC 6301, *Synechococcus* sp. PCC 7002 и *Anabaena* sp. PCC 7120 (уровень bootstrap-поддержки 92%). На аминокислотном дереве последовательности *cbbL-1* и *cbbL-2* группы «*Thiomicrospira*» формировали два отдельных кластера с неопределенным положением точек ответвления, в то время как *P. marinus* кластеризовался с *Synechococcus* sp. WH7803 (с высоким уровнем bootstrap-поддержки 99%) с почти равными длинами ветвей. Сходства группы «*Thiomicrospira*» и основного кластера цианобактерий на аминокислотном дереве не наблюдалось.

Результаты филогенетического анализа последовательностей генов *cbbL* для группы «*Thiomicrospira*» коррелируют с кластеризацией группы, получаемой в результате проведения анализа последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК (Рис. 4а-в). На дереве генов 16S рРНК *Tms. pelophila* образует кластер с видами рода *Thioalkalimicrobium* (кластер «*Tms. pelophila*»), в то время как *Tms. crunogena* и *Tms. kuenenii* образуют другой кластер с *H. marinus* (кластер «*Tms. crunogena*»). Однако, близкое родство генов *cbbL* этой группы генам *rbcL* цианобактерий противоречит филогенетическим взаимоотношениям, вытекающим из анализа генов, кодирующих 16S рРНК, согласно которому группа «*Thiomicrospira*» относится к γ -протеобактериям.

На нуклеотидном дереве гены *cbbM* видов рода *Thiomicrospira* и *H. marinus* образуют единый кластер (уровень bootstrap-поддержки 100%). Этот кластер попадает в точку ветвления, разделяющую тиоавтотрофных β - и γ -протеобактерий, принадлежащих к родам *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus*, *Halothiobacillus* и *Thiomonas*. На аминокислотном дереве только *Tms. pelophila* и *Tms. crunogena* остаются в тиоавтотрофном *cbbM* кластере, в то время как *Tms. kuenenii* и *H. marinus* с практически идентичными (98.1%) аминокислотными последовательностями формируют отдельную ветвь с неопределенной позицией точки ветвления (Рис. 5а,б) (Tourouva et al., 2006).

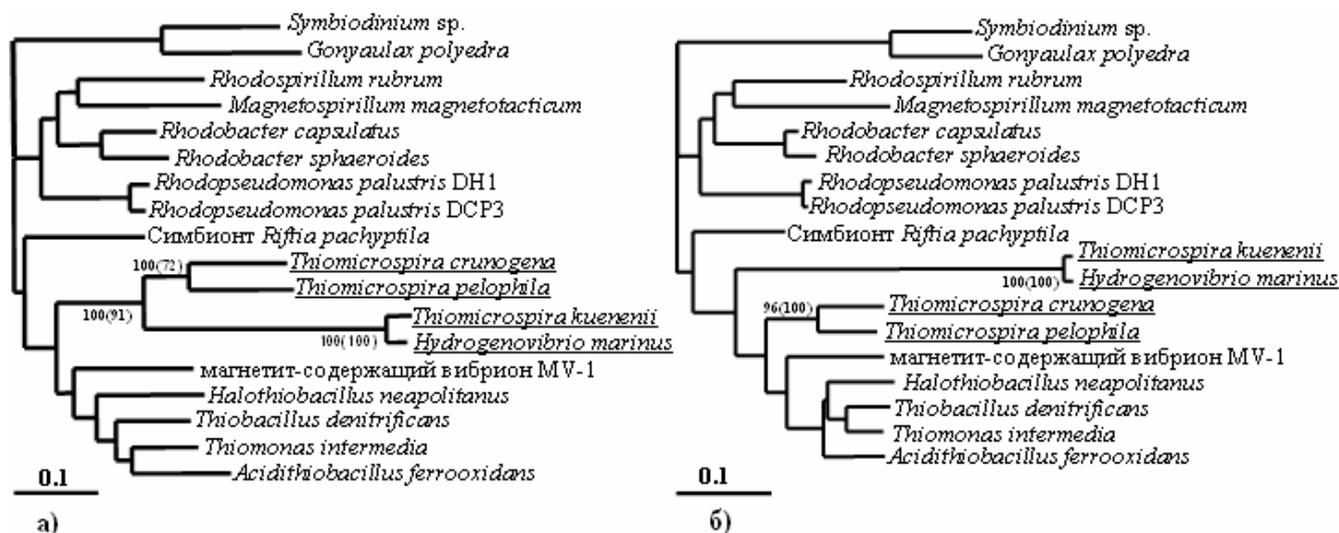


Рис. 5. Филогенетические деревья, построенные с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

а) нуклеотидных последовательностей генов *cbbM*;

б) транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbM*.

Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 нуклеотидов/аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (в скобках указаны значения для алгоритма maximum-parsimony). Последовательности исследованных бактерий подчеркнуты.

По результатам проведенного нами анализа частот использования кодонов генов *cbbL*, наиболее близким к группе «*Thiomicrospira*» оказался штамм *Anabaena* sp. PCC 7120.

Филогенетический анализ группы «*Thiomicrospira*» выявил неплохую корреляцию между данными, полученными на основании анализа последовательностей генов, кодирующих как 16S рРНК, так и РБФК. Прежде всего, анализ генов, кодирующих РБФК, свидетельствует о монофилетичности группы (включая ранее исследованный род *Hydrogenovibrio*), что следует из высокого уровня кластеризации этих генов на нуклеотидном дереве. Выделение в отдельную ветвь генов *cbbL-1* кластера «*Tms. crunogena*» и генов *cbbM* пары *Tms. kuenenii-H. marinus* на аминокислотном дереве может быть объяснено повышенной частотой несинонимичных замен в генах, кодирующих РБФК этих организмов.

Разделение группы «*Thiomicrospira*» на два кластера, основанное на результатах анализа генов, кодирующих 16S рРНК, коррелирует с результатами анализа генов *cbbL*. В частности, гены *cbbL-1* были обнаружены только в кластере «*Tms. crunogena*», а топологии деревьев, построенных на основании сравнения последовательностей *cbbL-2* и 16S рРНК, весьма сходны между собой.

Но, в то же время, внутреннее разделение группы на основании анализа генов *cbbM* недостаточно ясно, что может являться результатом специфичного пути эволюции этой формы РБФК и иного давления естественного отбора на форму II фермента для различных видов группы, в зависимости от занимаемых ими экологических ниш. Можно предположить, что сравнение последовательностей генов *cbbM* позволяет проследить только отдаленно родственные связи внутри всей группы «*Thiomicrospira*», но не более современную дивергенцию группы на два филогенетических кластера.

На основании ранее проведенного исследования трех оперонов генов, кодирующих две формы РБФК у *H. marinus*, его авторами (Yoshizawa et al., 2004) был предложен следующий сценарий их возникновения: предковая форма *H. marinus*, обладающая кластером генов *cbbM*, получила гены *cbbL-2* путем латерального переноса. Затем произошла дупликация генов *cbbL-2*. Последующая реорганизация их с генами кластера *cbbM* привела к образованию кластера генов *cbbL-1*.

Результаты проведенного нами исследования позволяют расширить эту гипотезу, предложив схему эволюции генов, кодирующих РБФК, для группы «*Thiomicrospira*» в целом. Сходство последовательностей генов *cbbL-2* и *cbbL-1* и их практически идентичные ГЦ-состав и частоты использования кодонов у всех исследованных представителей группы «*Thiomicrospira*» подтверждают предположение о дупликации, произошедшей в геноме предковой формы кластера «*Tms. crunogena*», от которой и произошли *Tms. crunogena*, *Tms. kuenenii* и *H. marinus*. Кроме того, принимая во внимание эволюционные расстояния и частоты использования кодонов, можно предположить, что наиболее вероятными донорами набора генов *cbbL-2* для предковой формы группы «*Thiomicrospira*» являлись цианобактерии (Рис.6).

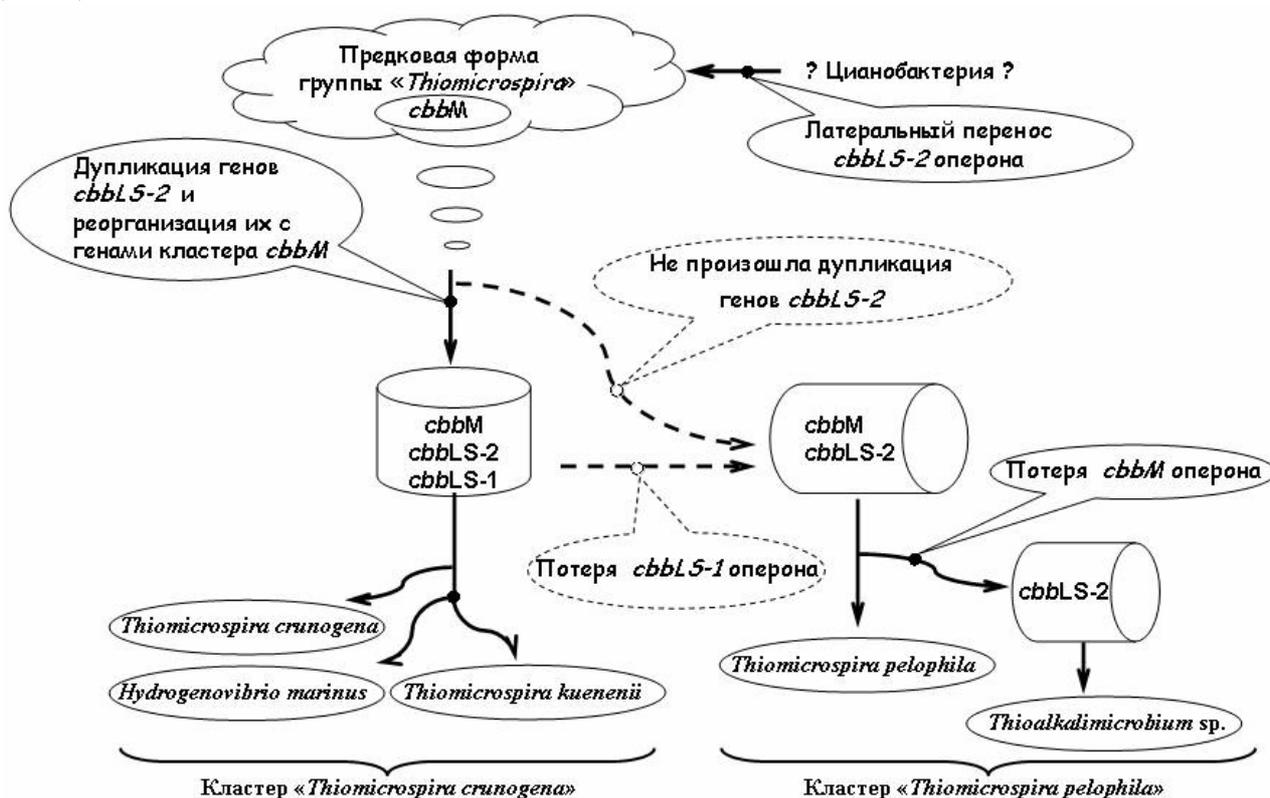


Рис. 6. Гипотетическая схема эволюции группы «*Thiomicrospira*».

Также, на основании полученных данных можно предположить два пути дальнейшей эволюции кластера «*Tms. pelophila*». Либо в геноме предковой формы этого кластера не произошла дупликация гена *cbbL-2*, либо дупликация все же произошла, но ген *cbbL-1* был утерян в процессе последующей эволюции группы. У представителей рода *Thioalkalimicrobium* также произошла потеря генов *cbbM* (Рис. 6).

Полученные в нашей работе результаты расширяют круг микроорганизмов, обладающих множественным набором генов *cbbL*. Причинами возникновения мультикопийности считаются латеральный перенос генов или дупликация генов (с возможной избирательной потерей одной из копий в процессе эволюции). Такого рода потеря могла быть результатом эволюционного отбора оптимальной формы РБФК. Поскольку РБФК формы I может избирательно ассимилировать CO₂, несмотря на присутствие кислорода, и является, таким образом, наиболее приспособленной к современным атмосферным условиям, присутствие дополнительных генов *cbbM* или *cbbL* не является обязательным. Поэтому вполне вероятно их инактивация и последующая потеря в зависимости от условий существования организмов.

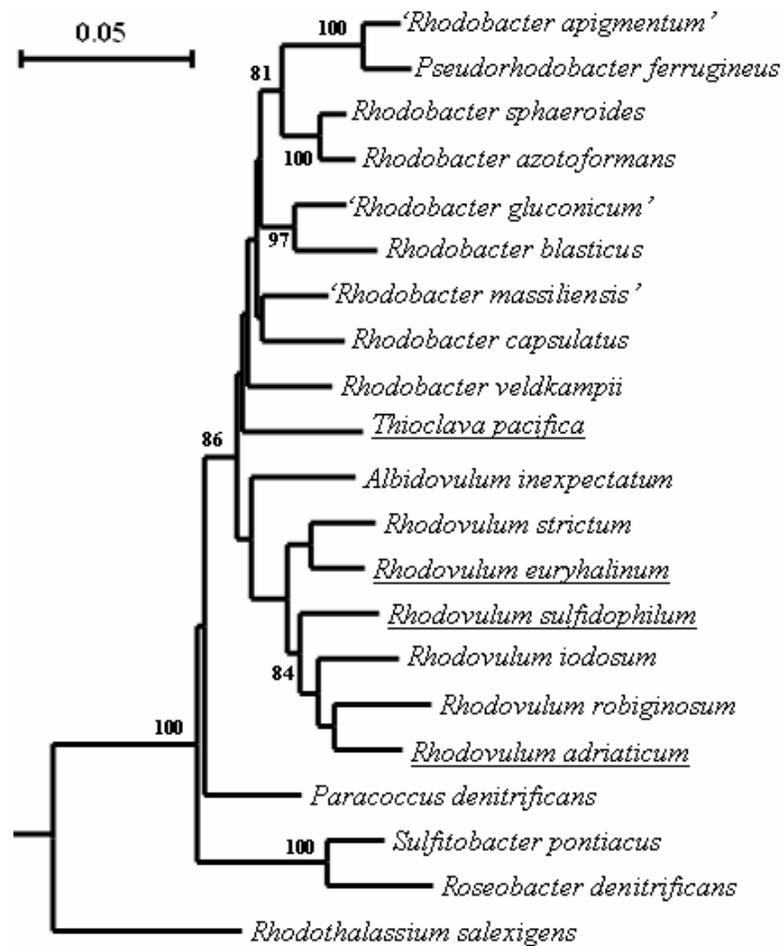
Возможно, что потеря генов *cbbL-1* и *cbbM* у представителей рода *Thioalkalimicrobium* (облигатных алкалифилов, выделенных из содовых озер) и *cbbL-1 Tms. pelophila* (алкалитолерантной бактерии) произошла как раз в связи с адаптацией к занимаемой экологической нише, а именно к низкой концентрации CO₂ при pH выше 8.

Однако, в некоторых эконических нишах наличие нескольких форм фермента с отличающимися каталитическими свойствами обеспечивает бактериям определенные экологические преимущества и гибкость. Подтверждением этому может служить тот факт, что *Tms. crunogena*, которая обладает тремя наборами генов, кодирующими РБФК, является наиболее быстрорастущим мезофильным хемолитоавтотрофом (Jannasch et al., 1985).

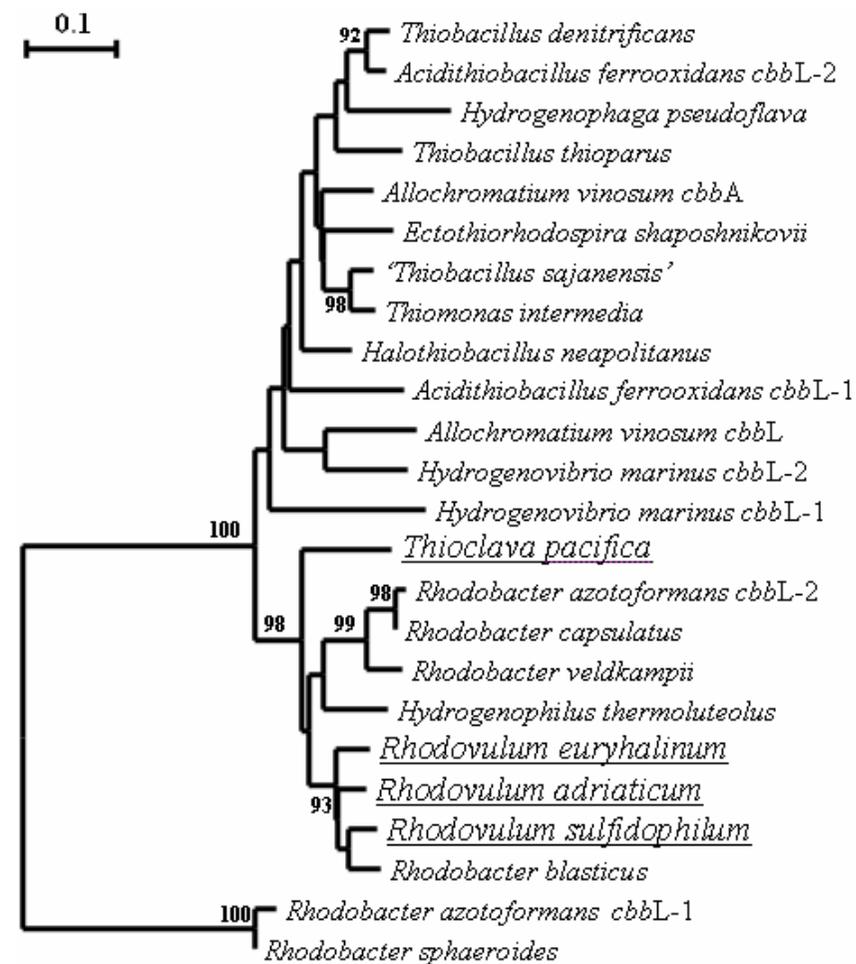
Результаты как анализа генов, кодирующих 16S рРНК, так и проведенного нами анализа генов, кодирующих РБФК, свидетельствуют в пользу необходимости таксономической ревизии этой группы; более конкретно – разделения ее на четыре рода внутри нового монофилетического семейства «*Thiomicrospiraceae*». Роды *Thioalkalimicrobium* и *Hydrogenovibrio* достаточно отделены от рода *Thiomicrospira* физиологически и генетически, чтобы сохранить за ними исходный родовой статус. Род *Thiomicrospira* предлагается разделить на два рода, основанных на кластерах «*Tms. crunogena*» и «*Tms. pelophila*».

2.2.4. р. *Thioclava*. Облигатно аэробная факультативно автотрофная СОБ *Thioclava pacifica* TL2^T была выделена из прибрежных морских гидротерм. Согласно результатам анализа генов, кодирующих 16S рРНК, *Tc. pacifica* формирует на филогенетическом древе отдельную ветвь, расположенную между пурпурными несерными бактериями родов *Rhodobacter* и *Rhodovulum* (Рис. 7а) с неустойчивым положением точки ответвления (уровень bootstrap-поддержки менее 24%). Уровни сходства гена, кодирующего 16S рРНК у *Tc. pacifica*, с аналогичными генами различных видов родов *Rhodobacter* и *Rhodovulum* были почти одинаковыми (92.4 – 95% гомологии) (Sorokin et al., 2005).

Поскольку для *Tc. pacifica* было показано наличие активности РБФК (Sorokin et al., 2005), для уточнения филогенетического положения нового организма в кластере *Rhodobacter*-*Rhodovulum* нами был проведен дополнительный филогенетический анализ генов, кодирующих РБФК. Ввиду отсутствия в базе данных GenBank последовательностей



a)



б)

Рис. 7. Филогенетические деревья, построенные с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

а) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов. Последовательности исследованных бактерий подчеркнуты;

б) транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 10 заменам на каждые 100 аминокислот. Последовательности генов *cbbL*, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (больше 80%).

РБФК каких-либо видов рода *Rhodovulum*, необходимых для проведения корректного сравнения, объектами исследования также стали типовые штаммы видов *Rdv. adriaticum*, *Rdv. euryhalinum* и *Rdv. sulfidophilum*. У всех исследованных штаммов были выявлены гены *cbbL* «зеленого» типа

Из результатов филогенетического анализа транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL* следует, что *Ts. pacifica* входит в кластер, также включающий α -протеобактерии родов *Rhodobacter* и *Rhodovulum* и β -протеобактерию *Hydrogenophilus thermoluteolus* (уровень bootstrap-поддержки 100%), но, тем не менее, образует на филогенетическом дереве обособленную ветвь (уровень bootstrap-поддержки 98%), только отдаленно родственную подкластеру *Rhodobacter-Rhodovulum-Hydrogenophilus* (Рис. 7б).

Таким образом, проведенный нами дополнительный филогенетический анализ, основанный на сравнении последовательностей генов *cbbL*, подтвердил обособленное положение *Ts. pacifica* среди фототрофных бактерий кластера *Rhodobacter-Rhodovulum* и правомочность выделения исследуемого организма в новый род.

3. Исследование разнообразия эндосимбиотического сообщества моллюска

Bathymodiolus azoricus. Для проверки эффективности разработанной нами системы праймеров при выявлении генов *cbbL* в молекулярно-экологических исследованиях, в качестве модельной экосистемы было выбрано симбиотическое бактериальное сообщество, обитающее в жабрах глубоководных двустворчатых моллюсков *Bathymodiolus azoricus*. Это сообщество было ранее исследовано цитологическими и физиолого-биохимическими методами, и было показано, что оно состоит всего из двух компонентов: тиаутотрофного и метанотрофного (Пименов и др., 2002).

Нами были проведены амплификация, клонирование и секвенирование фрагментов генов *cbbL* «зеленого» типа из суммарной ДНК, выделенной из жаберной ткани *B. azoricus*. Были выявлены два сиквенс-типа генов *cbbL*, которые, по результатам анализа сходства последовательностей, входили в кластер некультивируемых симбиотических и свободноживущих бактерий из морских гидротерм, которому принадлежал также и ранее изученный эндосимбионт *Bathymodiolus* sp. (номер доступа в GenBank AB038634) (Рис. 8).

Таким образом, выявление генов *cbbL* в сложной смеси, содержащей эукариотическую и прокариотические ДНК, свидетельствует об эффективности разработанной нами системы праймеров и показывает, что предлагаемая методика может служить основой для проведения исследования биоразнообразия автотрофных микроорганизмов в различных природных сообществах.

Применение системы праймеров, специфичной для генов, кодирующих 16S рРНК, выявило наличие в исследуемом сообществе только одного сиквенс-типа (Рис. 9а). Этот сиквенс-тип принадлежал кластеру γ -протеобактерий, содержащему всех ранее изученных тиаутотрофных симбионтов *Bathymodiolus*.

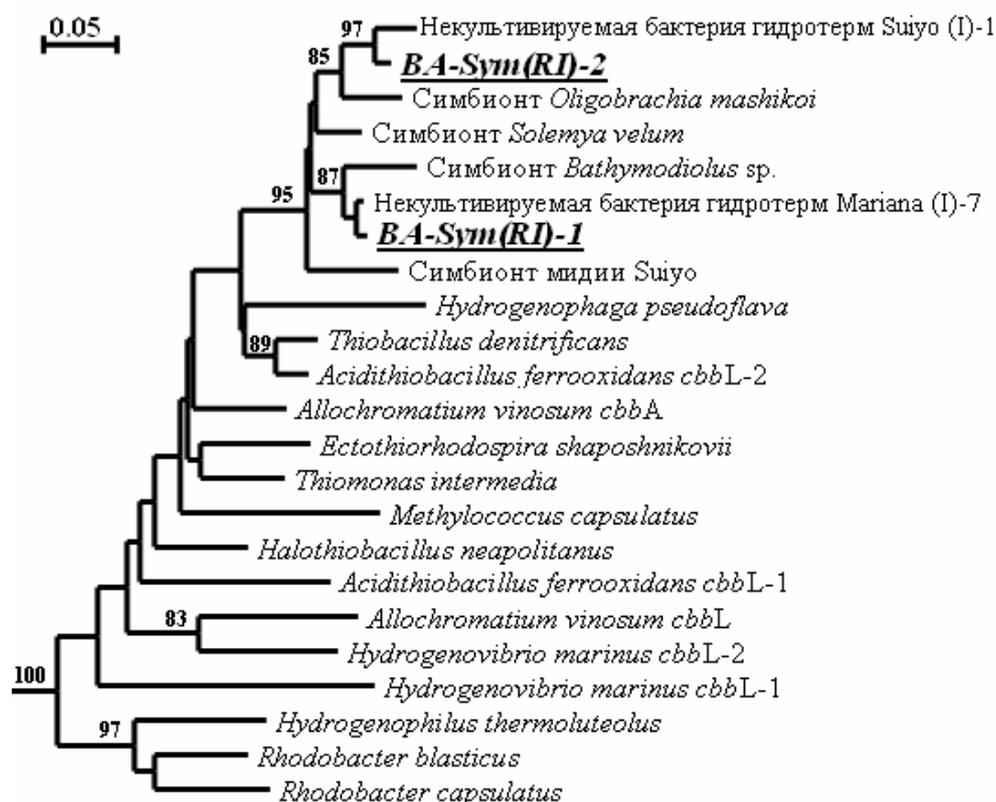


Рис.8. Положение эндосимбионтов *V. azoricus* на филогенетическом дереве, построенном с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения транслированных аминокислотных последовательностей генов *cbbL*. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 аминокислот. Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (больше 80%). Последовательности генов *cbbL*, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

Поскольку с помощью анализа 16S рДНК сообщества метанотрофный компонент обнаружен не был, его выявление проводили с применением системы праймеров, специфичной для генов, детерминирующих метанотрофию. В результате было показано наличие гена *pmoA*, кодирующего мембранную метанмонооксигеназу. Анализ сходства последовательностей генов *pmoA* указывает на принадлежность метанотрофного эндосимбионта *V. azoricus* к метанотрофам типа I (Рис. 9б).

Таким образом, результаты проведенного нами комплексного анализа генов подтверждают данные, полученные цитологическими и физиолого-биохимическими методами, о наличии тиавтотрофного и метанотрофного компонентов в составе симбиотического бактериального сообщества *V. azoricus* и показывают, что результаты анализа функциональных генов существенно дополняют выводы, получаемые при проведении стандартного анализа генов, кодирующих 16S рРНК.

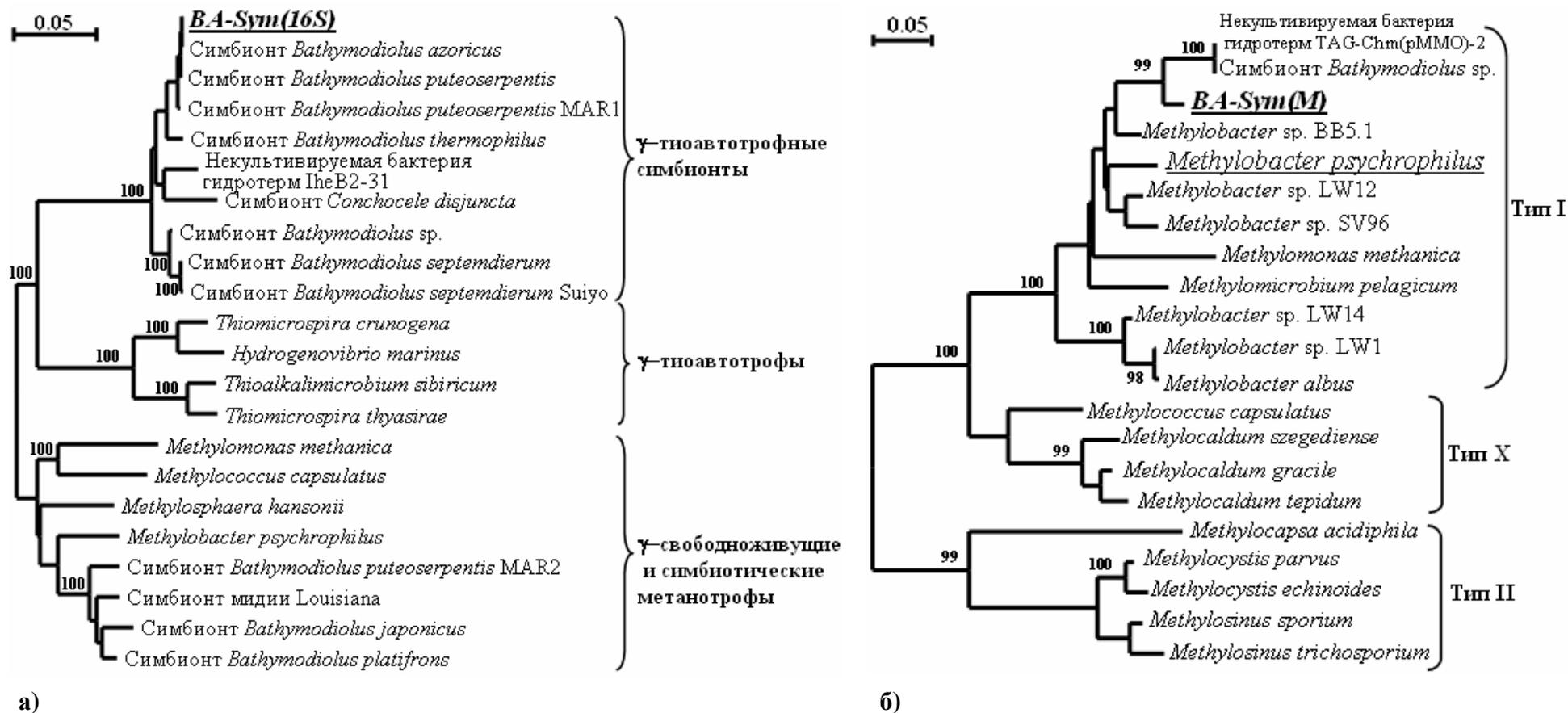


Рис. 9. Положение эндосимбионтов *B. azoricus* на филогенетическом дереве, построенном с использованием алгоритма neighbor-joining на основе сравнения:

- а) нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих 16S рРНК.
 б) транслированных аминокислотных последовательностей генов *rpoA*.

Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов/аминокислот.

Цифрами показана достоверность ветвления 1000 альтернативных деревьев с помощью bootstrap-анализа (больше 95%).

Последовательности генов, определенные в данном исследовании, выделены крупным шрифтом и подчеркнуты.

ВЫВОДЫ

1. Разработана универсальная система олигонуклеотидных праймеров для амплификации фрагментов генов, кодирующих большую субъединицу РБФК формы I, у бактерий различных таксономических групп; подобраны и оптимизированы условия полимеразной цепной реакции.
2. С помощью предложенной методики определена первичная структура и проведен филогенетический анализ фрагментов 32 генов, кодирующих РБФК формы I, у широкого круга серозависимых автотрофных бактерий.
3. Использование генов, кодирующих РБФК формы I, в качестве молекулярных маркеров позволило:
 - а) выявить особенности эволюции различных групп автотрофов, как это было показано на примере pp. *Oscillochloris*, *Thiobacillus*, *Thioalkalivibrio*;
 - б) предложить схему эволюции генов, кодирующих РБФК, и подтвердить необходимость таксономической реорганизации группы «*Thiomicrospira*»;
 - в) способствовать описанию новых таксонов автотрофов (pp. *Thiobacillus*, *Thioclava*, *Thioalkalispira*);
 - г) предположить существование нового варианта «красного» типа РБФК формы I у бактерий *Oscillochloris trichoides* и *Sulfobacillus acidophilus*.
4. На примере симбиотического бактериального сообщества, обитающего в жабрах глубоководных двустворчатых моллюсков рода *Bathymodiolus*:
 - а) показана эффективность разработанной системы праймеров при выявлении генов, кодирующих РБФК формы I, в молекулярно-экологических исследованиях;
 - б) показано, что результаты анализа функциональных генов могут существенно дополнить выводы, получаемые при проведении стандартного анализа генов, кодирующих 16S рРНК, и дать более полное представление о составе микробных сообществ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Спиридонова Е.М.**, Берг И.А., Колганова Т.В., Ивановский Р.Н., Кузнецов Б.Б., Турова Т.П. Система олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы у бактерий различных таксономических групп. Микробиология, 2004, т.73, №3, с.377-387
2. Турова Т.П., **Спиридонова Е.М.**, Берг И.А., Кузнецов Б.Б., Сорокин Д.Ю. Филогения генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы у облигатно автотрофных галоалкалофильных сероокисляющих бактерий рода *Thioalkalivibrio*. Микробиология, 2005, т.74, №3, с.378-386
3. Sorokin, D.Yu., Tourova, T.P., **Spiridonova, E.M.**, Rainey, F.A., Muyzer, G. *Thioclava pacifica* gen. nov., sp. nov., a novel facultatively autotrophic, marine, sulfur-oxidizing bacterium from a near-shore sulfidic hydrothermal area. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2005, v. 55, № 3, p. 1069-1075
4. Турова Т.П., **Спиридонова Е.М.**, Слободова Н.В., Булыгина Е.С., Кеппен О.И., Кузнецов Б.Б., Ивановский Р.Н. Филогения аноксигенных нитчатых фототрофных бактерий семейства *Oscillochloridaceae* на основании сравнительного анализа генов *rrs*, *cbbL* и *nifH*. Микробиология, 2006, т.75, №2, с.235–244
5. Tourova T.P., **Spiridonova E.M.**, Berg I.A., Kuznetsov B.B., Sorokin D.Yu. Occurrence, phylogeny and evolution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria of the genera *Thiomicrospira* and *Thioalkalimicrobium*. Microbiology, 2006, v. 152, №7, p. 2159-2169
6. Дульцева Н.М., Турова Т.П., **Спиридонова Е.М.**, Колганова Т.В., Осипов Г.А., Горленко В.М. *Thiobacillus sajanensis* sp.nov.–новая облигатно автотрофная сероокисляющая бактерия, выделенная из сероводородных источников Хойто-Гол, Бурятия. Микробиология, 2006, т.75, №5, с.670-681.
7. **Спиридонова Е.М.**, Кузнецов Б.Б., Пименов Н.В., Турова Т.П. Определение филогенетического разнообразия эндосимбионтов моллюска *Bathymodiolus azoricus* на основании анализа генов 16S рРНК, *cbbL* и *pmoA*. Микробиология, 2006. В печати.
8. Sorokin D. Yu., Tourova T.P., Kolganova T. V., **Spiridonova E. M.**, Berg I. A., Muyzer G. *Thiomicrospira halophila* sp. nov., a novel, moderately halophilic, obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium from hypersaline lakes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2006. In press.
9. **Spiridonova E.M.**, Kuznetsov B.B., Tourova T.P. Phylogenetic characterization of endosymbionts in hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. 1st International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld-2005), Badajoz, Spain, March 15-18th 2005. Book of Abstracts, p.182.
10. **Спиридонова Е.М.** Усовершенствование системы олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов РуБисКО у бактерий различных таксономических групп. XII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005», Москва, Россия, 12-15 апреля 2005 г. Тезисы докладов, с.203.
11. **Спиридонова Е.М.**, Берг И.А., Турова Т.П. Сравнительный анализ генов, кодирующих РуБисКО, у представителей рода *Thiomicrospira*. Всероссийская Молодежная школа-

конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, Россия, 1-3 ноября 2005 г. Тезисы докладов, с.80

12. **Спиридонова Е.М.**, Турова Т.П., Кеппен О.И., Ивановский Р.Н. Филогенетический анализ бактерий рода *Oscillochloris* на основе сравнения последовательностей генов, кодирующих РубисКО. Всероссийский симпозиум «Автотрофные микроорганизмы», Москва, Россия, 21 – 24 декабря 2005 г. Материалы симпозиума, с. 69.

13. **Spiridonova E. M.**, Berg I. A., Tourova T. P., Kuznetsov B. B., Sorokin D. Yu. Extended phylogenetic analysis of a first truly halophilic representative of the genus *Thiomicrospira*. 11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11), Vienna, Austria, August 20-25 2006. Book of Abstracts, p. 30.