

Н. Ю. Васильєва¹, К. Д. Крилова¹, Й. Б. Кристофферсен²,
О. А. Дубровіна¹, В. О. Іваниця¹

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

² Інститут Морської біології, біотехнології та аквакультури,
Грецький Центр Морських Досліджень, Гурнес 71500, 71003 Іракліон, Греція

МІКРОБНА РІЗНОМАНІТНІСТЬ ПРИБЕРЕЖНИХ ВОД ОДЕСЬКОЇ ЗАТОКИ ЧОРНОГО МОРЯ

Метою дослідження було визначення біорізноманітності прокариотної мікробіоти прибережної води Одеської затоки Чорного моря шляхом метагеномного аналізу. **Методи.** Проби морської води відбирали в районі гідробіологічної станції ОНУ імені І. І. Мечникова (46°26'28.2"N 30°46'20.0"E) з горизонту 100 см, фільтрували через 0,22 μm мембранні фільтри (Sartorius). Сумарну ДНК виділяли з зібраних мікроорганізмів за допомогою PowerWater DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF) згідно з інструкцією виробника (MO BioLaboratories). Для визначення мікробної різноманітності методами метагеномного аналізу використовували таргетне секвенування ділянки v4 гена 16S рРНК на платформі Illumina MiSeq. Отримані послідовності у форматі fastq аналізували в оболонці miniconda3 з послідовним використанням програм Fastqcv.0.11.2., Trimmomatic, Cutadapter, SPAdes, Centrifuge і Krona. **Результати.** В результаті метагеномного 16S рРНК аналізу в прибережних водах Одеської затоки було отримано 261197 анованих послідовностей. Виявлено представників основних відділів домену Bacteria: Proteobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Verrucomicrobiota, Deferribacteres, Planctomycetes, Tenericutes, Aquificae, Deinococci, Thermotogae, Ignavibacteriales, Fibrobacteri. Найбільш поширеними відділами домену Bacteria є Proteobacteria (68,0%) і Bacteroidetes (19,0%). Серед відділу Proteobacteria переважають класи Gammaproteobacteria (63,0%) і Alphaproteobacteria (31,0%). Показано присутність незначної кількості представників домену Archaea (менше 0,5%) класів Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota. **Висновки.** Порівняльний аналіз результатів, наведених і отриманих у попередніх дослідженнях біологічної різноманітності морської мікробіоти води Причорноморських лиманів і прибережних вод острова Зміїний дозволили визначити основні відмінності у їх складі. Показано, що здебільшого мікробіота морської води Одеської затоки як і Хаджибейського лиману та прибережної води острова Зміїний різноманітна і представлена в основному членами відділів Proteobacteria і Bacteroidetes, в той час як у Сухому і Дністровському лиманах переважають представники відділу Cyanobacteria.

Ключові слова: Одеська затока, Чорне море, морська вода, метагеномний 16S рРНК аналіз, мікробна біорізноманітність.



Чорне море це унікальна морська екосистема, у якій мікробіота визначає біогеохімічні процеси у всій водній товщі та формує фізико-хімічні умови для існування інших гідробіонтів. Мікробіологічні дослідження, проведені в другій половині XX століття, не дали достатньої інформації про таксономічний склад мікроорганізмів, що населяють прибережні та глибинні води Чорного моря. Більшість сучасних досліджень присвячено вивченню донних осадів [5], сульфатредукувальних бактерій [8, 16], зелених сірчаних бактерій [11, 15] і метанокиснювальних бактерій [12, 13].

Застосування біоінформативного аналізу сумарного геному дало можливість отримати уявлення про розподіл прокариотних мікроорганізмів, їх біологічну різноманітність та біогеохімічний потенціал морського мікробіому [6, 7, 14]. Так, наприклад, проведені метагеномні дослідження води Чорного моря пролили світло на таксономічний склад морських мікроорганізмів за горизонтального зонування [6]. Комплексними є дослідження Todorova с колегами, які присвячені вивченню мікробної різноманітності донних осадів Чорного моря біля берегів Болгарії – були найбільш цікавили у цьому сенсі [17].

Роботами мікробіологів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова показано, що у воді біля острова Зміїний домен *Bacteria* представлений переважно відділом *Proteobacteria*, а також виявлено представників *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetes*, *Tenericutes*, *SRI*, *Fusobacteria* і *Firmicutes*. Досліджено склад мікробіоти причорноморських лиманів та показано, що в Хаджибейському лимані також переважали представники відділу *Proteobacteria*, в той час як в Сухому і Дністровському лиманах – представники відділу *Cyanobacteria*.

Метою даного дослідження було визначити біорізноманітність прокариотної мікробіоти в прибережній воді Одеської затоки Чорного моря шляхом метагеномного аналізу, що може дозволити з'ясувати основні тенденції у формуванні мікробних угруповань в залежності від території і супутніх умов, географічного розташування та антропогенного навантаження.

Матеріали та методи

Пробу морської води з горизонту 100 см відбирали в Одеській затоці Чорного моря в районі Гідробіологічної станції Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (координати 46°26'28.2"N 30°46'20.0"E), фільтрували через 0,22 μm мембранні фільтри (Sartorius) для збору мікроорганізмів. Сумарну ДНК зі зразка проби морської води виділяли з зібраних мікроорганізмів за допомогою Power Water DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF) згідно з інструкцією виробника (MO Bio Laboratories).

Дизайн праймерів відповідав протоколу Kozich et al [9]. В результаті секвенування, яке проводили на платформі Illumina MiSeq, було отримано 8276830 сирих рідів. Як адаптери використовували наступні послідовності: R1 – AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCA і R2 – AGATCGGAAGAGCGTCTGTAGGGAAAGAGTGT.

Як праймери для регіону v4 16S рРНК використовували послідовності: F – GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, R – GGACTACHVGG GTWTCTAAT.

ПЛР виконували з використанням наборів КАРА HiFi HotStart PCR kits



(Кара Biosystems). Кожна з сумішей складалася з 0,2 М Trehalose, 5 μ l Fidelity buffer, 0,75 μ l KAPA dNTP mix, 0,3 μ M прямого і зворотного праймера, 0,5 одиниць KAPA HiFi полімерази, близько 25ng матричної ДНК, і доводили суміш до 25 μ l дейонізованою водою. Умови для теплових циклів були: 95 °C – 3 хв., потім 27 циклів при 98 °C – 20 сек, 61 °C – 10 сек, і 72 °C – 15 сек. Фінальну елонгацію виконували 5 хв при 72 °C.

Продукти ПЛР очищали за допомогою набору AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter). Остаточну концентрацію отриманої бібліотеки амплікон 16S rDNA обчислювали з використанням набору KAPA Universal qPCR kit (Кара Biosystems) перед запуском секвенування. Демультплексування було вироблено автоматично програмою MiSeqReporter по завершенню секвенування.

Аналіз отриманих рідів здійснювали на комп'ютері Apple з операційною системою MacOSX 10.11 El Capitan та використанням оболонки miniconda3. Якість послідовності перевіряли за допомогою програми Fastqcv.0.11.2 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Потім послідовно використовували програми Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) і Cutadapt (<https://github.com/marcelm/cutadapt>) з метою виділити послідовності адаптерів, праймерів і високо повторюваних ділянок, після чого проводили повторний контроль їх якості.

Після процедури «очищення» послідовностей використовували асемблер SPAdes (<http://bioinf.spbau.ru/en/spades>). У роботі використовували модуль metaSPAdes. Таксономічне профілювання здійснюється за допомогою Centrifuge (<http://www.ccb.jhu.edu/software/centrifuge/index.shtml>).

Візуалізацію результатів проводили за допомогою інтерактивного візуалізатора Krona (<https://github.com/marbl/Krona/wiki>). Після проведення метагеномного асемблеру і таксономічного профілювання було отримано 261197 анотованих послідовностей.

Результати та їх обговорення

У результаті проведеного 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*, *Fibroacteria*, *Gemmatimonadetes* та домену Archaea: *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota*, що свідчить про широкий спектр прокаріотних мікроорганізмів у досліджуваній пробі морської води.

Слід відмітити, що основні відділи домену Bacteria були ідентифіковані також за метагеномного аналізу 16S рРНК проб води з акваторії острова Зміїний [3] і проб з чорноморських лиманів південного заходу України [4], 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% [4], а в морській воді з Одеської затоки в районі Гідробіологічної станції частка ідентифікованих послідовностей відділу *Firmicutes* склала 5,0% (табл. 1).

Таблиця 1

Кількісний розподіл представників домену *Bacteria* на рівні відділів

Table 1

Quantity distribution of *Bacteria* domain representatives at the phylum level

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
Суанобacteria	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
Aquificae	0,09	Synergistia	0,01
Chlorobia	0,09	Fibrobacteria	0,008
Chloroflexi	0,08	Gemmatimonadetes	0,006

Найбільш поширений відділ *Proteobacteria* (68,0%) представлений класами γ -*Proteobacteria* (63,0%) і α -*Proteobacteria* (31,0%). Кількість β -*Proteobacteria* склала 4,0% від усіх послідовностей, а δ -*Proteobacteria* близько 2,0% (рис. 1). Аналогічну картину спостерігали, у воді Чорного моря біля острова Зміїний [4]. При дещо меншій загальній кількості представників відділу *Proteobacteria* (51,4%) найбільш представленими були γ -*Proteobacteria* і α -*Proteobacteria*. За даними Costantino et al [6] в зразках води, зібраних з глибини 20-40 м члени групи γ -*Proteobacteria* були присутні на усіх глибинних ділянках і представляли собою панівний таксон.

Представники класу β -*Proteobacteria* представлені родинами *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Oxalobacteraceae* порядку *Burkholderiales*.

Серед бактерій класу δ -*Proteobacteria* визначені порядки *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales* і *Desulfuromonadales*, тобто сульфатредуквальні бактерії, які, як показали Costantino et al, переважно зустрічалися на глибинах нижче хемоклину [6].

Серед представників класу γ -*Proteobacteria*, 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*).



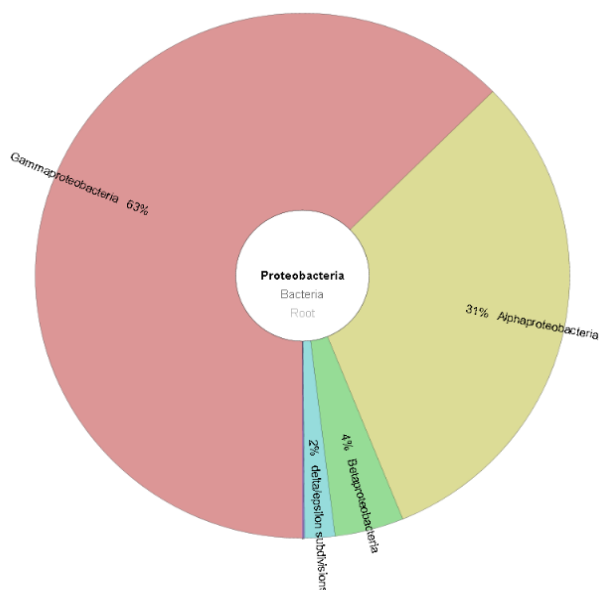


Рис. 1. Таксономічний склад бактерій відділу *Proteobacteria*

Fig. 1. Taxonomic composition of bacteria in *Proteobacteria* phylum

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* були найбільш чисельними серед відділу *Bacteroidetes* (89,0%). Кількість ідентифікованих послідовностей, що віднесені до класів *Sphingobacteria*, *Cytophagia* та *Bacteroidia* була набагато меншою (рис. 2), що співпадає з результатами отриманими для води з акваторії острова Зміїний [4].

Бактерії відділу *Cyanobacteria*, що відомі як типові морські мешканці, складають лише 2,0% від усіх виявлених послідовностей. Найбільш поширеними серед них були члени класів *Synechococcales* (67,0% *Cyanobacteria*) і *Oscillatoriothycideae* (17,0%). Представники порядків *Nostocales*, *Gloeobacteria* та *Pleurocapsales* присутні у незначній кількості (рис. 3). При цьому, у воді акваторії острова Зміїний кількість представників *Cyanobacteria* досягали 11,1% від усіх виявлених послідовностей [4].

Чисельність представників відділу *Firmicutes* була набагато більша ніж в воді акваторії острова Зміїний [4] і складала 5,0%. Серед представників цього класу ідентифіковані послідовності, що відносяться до порядків *Bacillales* і *Lactobacillales*.

Порядок *Bacillales* представлений родинami *Bacillaceae*, *Staphylococcaceae*, *Paenibacillaceae*, *Listeriaceae*, *Planococcaceae*, *Alicyclobacillaceae* (рис. 4), порядок *Lactobacillales* – родинami *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae*, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Streptococcaceae* (рис. 5).

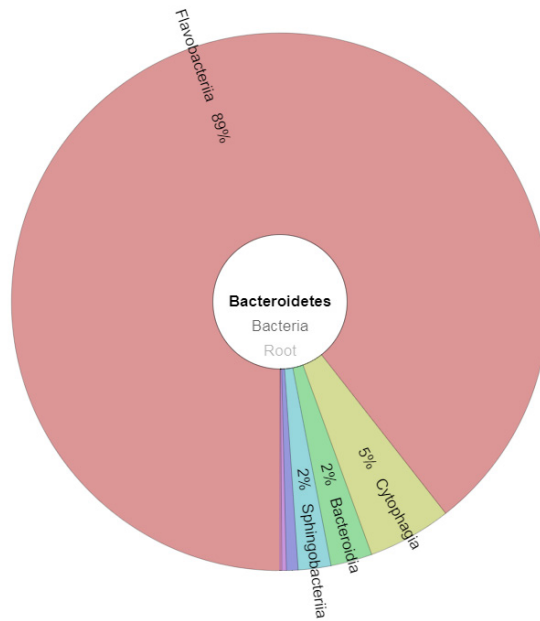


Рис. 2. Таксономічний склад бактерій відділу *Bacteroidetes*
Fig. 2. Taxonomic composition of bacteria in *Bacteroidetes* phylum

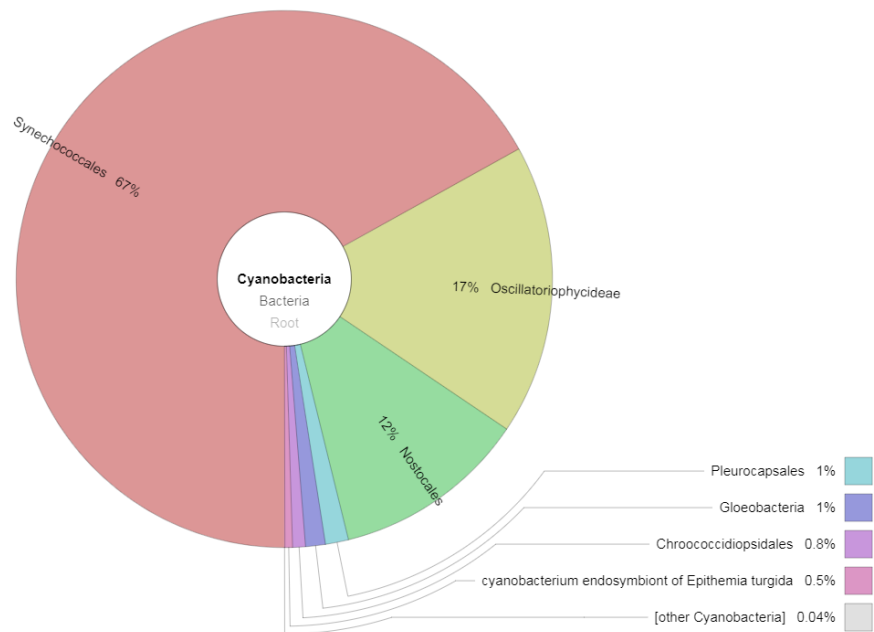


Рис. 3. Таксономічний склад бактерій відділу *Cyanobacteria*
Fig. 3. Taxonomic composition of bacteria in *Cyanobacteria* phylum



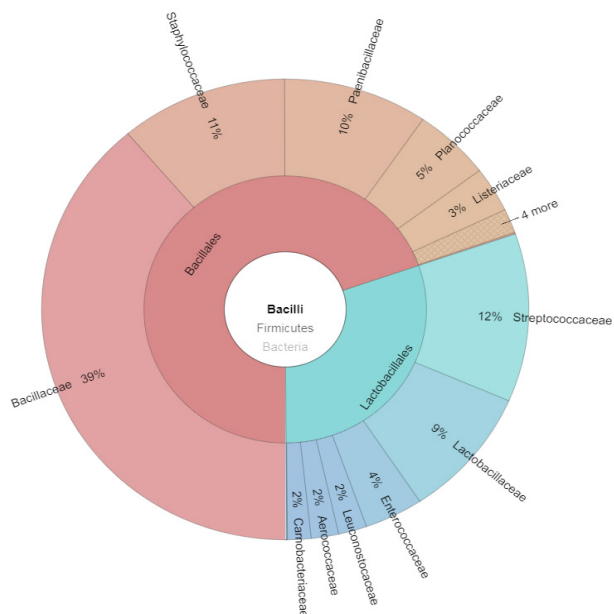


Рис. 4. Таксономічний склад бактерій порядку *Bacillales*

Fig. 4. Taxonomic composition of bacteria in the *Bacillales* order

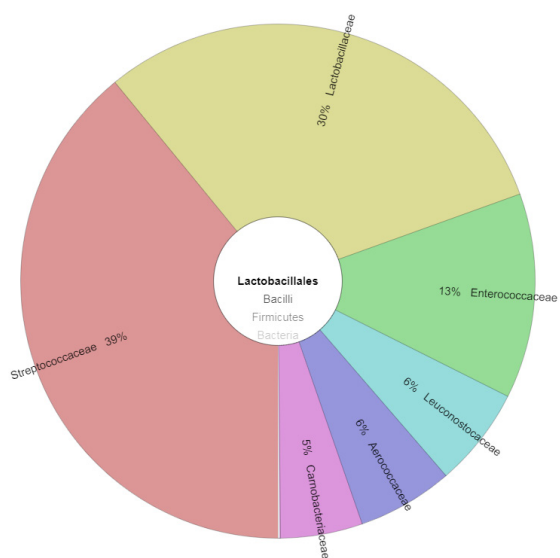


Рис. 5. Таксономічний склад бактерій порядку *Lactobacillales*

Fig. 5. Taxonomic composition of bacteria in the *Lactobacillales* order

Досить цікавим є визначення представників домену *Archaea* (відділи *Euryarchaeota*, *Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota*) у прибережній воді (0,5%). *Thaumarchaeota* є хемолітотрофами, здатними окиснювати аміак, присутність якого часто відмічається у глибинних водах [2]. А *Euryarchaeota* у більшості залежить від кількості та якості органічних поживних ресурсів, що підтверджує їх гетеротрофний (або міксотрофний) тип метаболізму *Euryarchaeota* [10]. *Crenarchaeota* також відносяться до архей, та їх фізіолого-біохімічні властивості більш різноманітні: серед *Crenarchaeota* є ацидофіли і нейтрофіли, суворі і факультативні анаероби та суворі аероби, хемолітоавтотрофи і хемоорганотрофи. Вони можуть використовувати сірку у своєму метаболізмі [1].

Як видно з рисунку 7 таксономічна різноманітність прокаріотної спільноти води Хаджибейського лиману [3], акваторії острова Зміїний Чорного моря [4] та її прибережної частини Одеської затоки подібні між собою. Різниця для цих проб більш виражена у кількісному вимірі ніж у таксономічному і проявляється вже на рівні відділів.

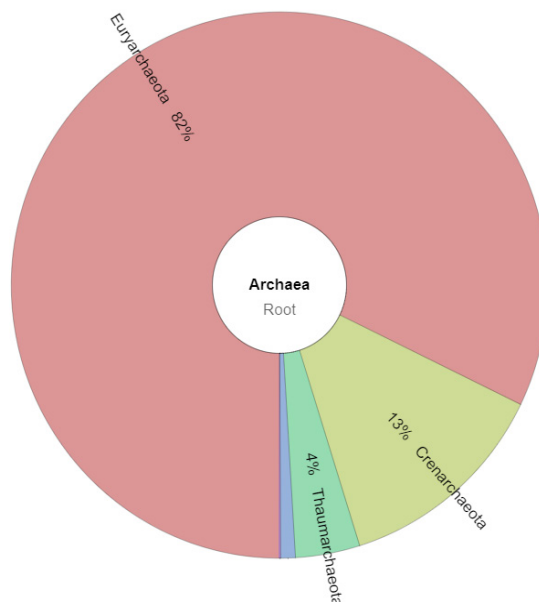


Рис. 6. Таксономічний склад відділів домену *Archaea*

Fig. 6. Taxonomic composition of the *Archaea* domain

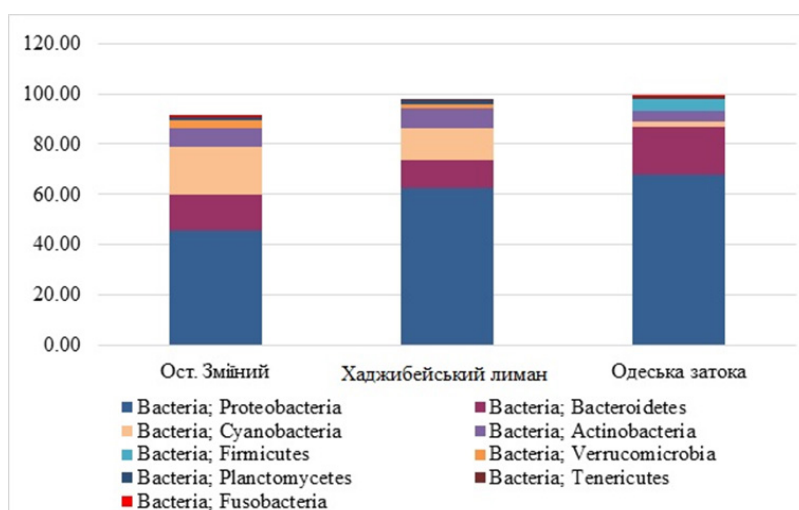


Рис. 7. Порівняльна характеристика біологічної різноманітності прокаріот води акваторій острова Зміїний, Хаджибейського лиману та Одеської затоки Чорного моря

Fig. 7. Comparative results of the metagenomic analysis of the open water area of the Black Sea (Zmeiny Island), Khadzhybei estuary and from the coastal seawater of the Black Sea (Biological station)

Отже, порівняльний аналіз результатів наведених у цій статті та отриманих у попередніх дослідженнях біологічної різноманітності морської мікробіоти води Причорноморських лиманів і прибережних вод острова Зміїний дозволили визначити основні відмінності у їх складі. Показано, що здебільшого мікробіота морської води Одеської затоки як і Хаджибейського лиману та прибережної води острова Зміїний різноманітна і представлена переважно членами відділів *Proteobacteria* і *Bacteroidetes*, в той час як у Сухому і Дністровському лиманах переважають представники відділу *Cyanobacteria* [3].

N. Yu. Vasyleva¹, K. D. Krylova¹, J. B. Kristoffersen²,
O. A. Dubrovina¹, V. O. Ivanytsia¹

¹ Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., 65082, Odesa, Ukraine,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

² Institute of Marine Biology, Biotechnology and Aquaculture, Hellenic Centre for Marine Research, Gournes 71500, 71003 Heraklion, Greece

MICROBIAL DIVERSITY OF COASTAL WATERS OF ODESA BAY OF THE BLACK SEA

The **aim** of the study was to determine the biodiversity of the prokaryotic microbiota of the coastal water of Odesa Bay of the Black Sea with the help of metagenomics analysis. **Methods.** Sample of sea water was taken in the area of Hydrobiological station of Odesa I. I. Mechnikov National University (46°26'28.2"N 30°46'20.0" E). Sample of sea water was taken from the horizon of 100 cm and filtered through



0.22 μm membrane filters (Sartorius). Total DNA was isolated from the collected microorganisms using the PowerWater DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF) according to the manufacturer's instructions (MO BioLaboratories). Total DNA extraction has been performed according to the manufacturer's instructions (MO BioLaboratories) from collected microorganisms using the PowerWater DNA isolation kit (catalog no.14900-50-NF). To determine the microbial diversity with the help of metagenomic analysis, there were carried out targeted sequencing performed on the Illumina MiSeq platform after amplify v4 region of the 16S rRNA gene. The obtained sequences in the fastq format were analyzed in the miniconda3 shell with used next programs: Fastqcv.0.11.2., Trimmomatic, Cutadapter, SPAdes, Centrifuge and Krona. **Results.** As a result of the metagenomics 16S rRNA gene analysis of the coastal waters of Odesa Bay about 261 197 annotated sequences were defined. The representatives of main departments of the domain Bacteria were identified: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Cyanobacteria, Tenericutes, Spirochaetia, Fusobacteria, Thermotogae, Deinococci, Aquificae, Chlorobia, Chloroflexi, Verrucomicrobia, Deferribacteres, Planctomycetes, Chlamydia, Acidobacteria, Nitrospirae, Ignavibacteriae, Thermodesulfobacteria, Dictyoglomia, Elusimicrobia, Synergistia, Fibrobacteria, Gemmatimonadetes. The most common departments of Bacteria domain were Proteobacteria (68.0%) and Bacteroidetes (19.0%). The representatives of Gammaproteobacteria (63.0%) and Alphaproteobacteria (31.0%) were dominated among the Proteobacteria. The presence of small amount of representatives of the Archaea domain (less than 0.5%) as the classes Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Crenarchaeota was shown. **Conclusion.** A comparative analysis of the presented results and those that were obtained during previous studies of the biological diversity of microbial communities in the Black Sea estuaries and in the region of the Zmiinyi Island made it possible to determine the main differences in their composition. As it was shown, microbial communities of the coastal water of Odesa Bay, water of the Khadzhybei estuary and in the region of the Zmiinyi Island is manifold and is represented mainly by the members of Proteobacteria and Bacteroidetes while representatives from Cyanobacteria phylum is dominate in the Dry and Dniester estuaries.

Key words: Odesa Bay, the Black Sea, seawater, 16S rRNA gene-based metagenomic analysis, microbial biodiversity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Воробьева Л. И. Археи: учебное пособие для вузов. — М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. — 447 с.
2. Berg C., Listmann L., Vandieken V., et al. Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea// Front. Microbiol. — 2015. — Vol. 15, № 5. — Article 786. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00786>
3. Bobrova O, Kristoffersen JB, 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;63(2):315-9. doi: 10.18388/abp.2015_1145. Epub 2016 Feb 29.
4. Bobrova O. E., Kristoffersen 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. – Vol. 2. – P. 6–9. doi: 10.18524/2307-4663.2015.2(30).48066

5. Collins C. P., Carlsson J., Rowcroft P., Tibbles B. Ecosystem status of the deep Black Sea, soft sediment, benthic community//Marine Policy. – 2016. – Vol. 73. – P. 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2016.07.016>

6. 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. – Vol. 69, No. 11. – P. 6481–6488. doi: 10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003

7. DeLong E. F, Preston C. M, Mincer T, Rich V, Hallam S. J, Frigaard N. U, et al. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. Science. 2006; 311: 496–503. doi: 10.1126/science.1120250

8. Jannasch HW. Microbial processes in the Black Sea water column and top sediment: an overview// Black Sea oceanography. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – 1991. – P. 271–286.

9. 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

10. Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G. et al., Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins // Nature. – 2013. – Vol. 496. – P. 215–218 doi:10.1038/nature12033

11. Ludwig A. K., Henßge Uta, Glaeser J. Subfossil 16S rRNA Gene Sequences of Green Sulfur Bacteria in the Black Sea and Their Implications for Past Photic Zone Anoxia // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 74, No.3. – P. 624–632. doi:10.1128/AEM.02137-07

12. Mirko Basen, Martin Krüger, Jana Milucka. Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane// Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 13, No. 5. – P. 1370–1379. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02443.x

13. Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane//Science.–2002. – Vol. 297. – P. 1013–1015 doi: 10.1126/science.1072502

14. Schauer R., Bienhold C., Ramette A, Harder J. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean// International Society for Microbial Ecology. – 2010. – Vol.4. – P. 159–170. doi:10.1038/ismej.2009.106

15. Takao Iino, Koji Mori, Yoshihito Uchino, et al., Ignavibacterium album gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of Ignavibacteria classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria// International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2010. – Vol. 60. – P. 1376–1382 doi:10.1099/ijs.0.012484-0

16. Thamdrup B., Rossello-Mora R., Amann R. Microbial Manganese and Sulfate Reduction in Black Sea Shelf Sediments// Applied and environmental



microbiology. – 2000. – Vol. 66, No. 7. – P. 2888–2897.

17. *Todorova H. N., Mironova S. R., Karamfilov K. V.* Comparative molecular analysis of bacterial communities inhabiting pristine and polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons Black Sea coastal sediments// *Marine Pollution Bulletin.* – 2014. – Vol. 83. – P. 231–240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.047>

References

1. *Vorobeva LI.* Arhei: uchebnoe posobie dlya vuzov.2007. Moskva:IKTs «Akademkniga». 447. – (in Russian).

2. *Berg C, Listmann L, Vandieken V, et al.* Chemoautotrophic growth of ammonia-oxidizing Thaumarchaeota enriched from a pelagic redox gradient in the Baltic Sea. *Front. Microbiol.* 2015;15(5):article 786. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00786>

3. *Bobrova O, Kristoffersen JB, 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;63(2):315-319. doi: 10.18388/abp.2015_1145. Epub 2016 Feb 29.

4. *Bobrova OE, Kristoffersen J, Ivanytsia VO.* Metagenome 16S rRNA gene analysis of the Black Sea microbial diversity in the region of the Zmiinyi Island. *Microbiology & Biotechnology.* 2015;(2):6-19. doi: 10.18524/2307-4663.2015.2(30).48066

5. *Collins CP, Carlsson J, Rowcroft P, Tibbles B.* Ecosystem status of the deep Black Sea, soft sediment, benthic community. *Marine Policy.* 2016;(73):216-223. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2016.07.016>

6. *Costantino V, Hiep VT, Lee JK.* Fingerprinting Microbial Assemblages from the Oxic/Anoxic Chemocline of the Black Sea. *Applied and environmental microbiology.* 2003;69(11):6481–6488. doi: 10.1128/AEM.69.11.6481-6488.2003

7. *DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, et al.* Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science.* 2006;(311):496-503. doi: 10.1126/science.1120250

8. *Jannasch HW.* Microbial processes in the Black Sea water column and top sediment: an overview. *Black Sea oceanography.* 1991 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. – P. 271–286.

9. *Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD.* 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;(79):5112-5120. doi: 10.1128/AEM.01043-13

10. *Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, et al.,* Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature.* 2013;(496):215-218. doi:10.1038/nature12033

11. *Ludwig AK, Henßge Uta, Glaeser J.* Subfossil 16S rRNA Gene Sequences of Green Sulfur Bacteria in the Black Sea and Their Implications for Past Photic Zone Anoxia. *Applied and Environmental Microbiology.* 2008;74(3): 624-632. doi:10.1128/AEM.02137-07

12. *Mirko Basen, Martin Krüger, Jana Milucka.* Bacterial enzymes for



dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology*. 2011;13(5):1370–1379. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02443.x

13. *Michaelis W, Seifert R, Nauhaus K*. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*.2002;(297):1013-1015 doi: 10.1126/science.1072502

14. *Schauer R, Bienhold C, Ramette A, Harder J*. Bacterial diversity and biogeography in deep-sea surface sediments of the South Atlantic Ocean. *International Society for Microbial Ecology*. 2010;(4):159-170. doi:10.1038/ismej.2009.106

15. *Takao Iino, Koji Mori, Yoshihito Uchino, et al.*, *Ignavibacterium album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov., for a novel lineage at the periphery of green sulfur bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010;(60): 1376-1382. doi:10.1099/ijs.0.012484-0

16. *Thamdrup B, Rossello-Mora R, Amann R*. Microbial Manganese and Sulfate Reduction in Black Sea Shelf Sediments. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(7): 2888-2897.

17. *Todorova HN, Mironova SR, Karamfilov KV*. Comparative molecular analysis of bacterial communities inhabiting pristine and polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons Black Sea coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin*. 2014;(83):231-240. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.047>

Стаття надійшла до редакції 05.11.2018 р.

