

ФОТОТРОФНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В СИМБИОТИЧЕСКИХ СООБЩЕСТВАХ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК: РАЗНООБРАЗИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ БЕЛКА D1 ФОТОСИСТЕМЫ II (*psbA*)

© 2017 г. О. В. Калюжная*, В. Б. Ицкович

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: kaluzhnaya.oks@gmail.com

Поступила в редакцию 30.03.2016 г.

Принята к печати 11.05.2016 г.

Ген *psbA*, кодирующий основной белок фотосистемы II (белок II, белок D1), служит маркером присутствия микроорганизмов-фотосинтетиков в водных сообществах. Этот маркер впервые использован нами для изучения разнообразия фототрофной микрофлоры пресноводных беспозвоночных животных. Объект исследования — микробные ассоциации эндемичной байкальской губки *Baikalospongia intermedia*, а также окружающее губку водное сообщество микроорганизмов. Результаты анализа последовательностей гена *psbA* в исследуемых микробиомах свидетельствуют о присутствии в них представителей таких фотосинтезирующих групп, как цианобактерии (филум Cyanobacteria), зеленые (отд. Chlorophyta), разножгутиковые (отд. Heterokonta), гаптофитовые (отд. Haptophyta), охрофитовые (отд. Ochrophyta) водоросли, а также цианофагов. В общей сложности, в микробных ассоциациях эндемичной губки *B. intermedia* выявлено 35, а в водном сообществе — 32 уникальных последовательностей гена *psbA*. Результаты работы свидетельствуют об участии симбиотических сообществ губок в накоплении первичной продукции и круговороте углерода в экосистеме оз. Байкал.

Ключевые слова: оз. Байкал, пресноводные губки, *Baikalospongia intermedia*, симбиотическое сообщество, ген *psbA*, фототрофные микроорганизмы

DOI: 10.7868/S0026898417030089

Микробный кислородный фотосинтез — ключевой метаболический процесс на Земле и главная движущая сила эволюции растений и многоклеточных животных. Фототрофные микроорганизмы Мирового Океана аккумулируют около половины первичной продукции Биосферы [1]. Многие из них являются симбионтами фильтрующих воду бентосных животных [2–4].

Губки (тип Porifera), населяя разнообразные морские и пресноводные места обитания, формируют тесные ассоциации с про- и эукариотическими микроорганизмами, которые могут составлять до 70% биомассы сообщества губки [4]. Показано, что некоторые фототрофные представители симбиотической микрофлоры служат для губки дополнительным источником углерода, накапливая в своих клетках продукты его ассимиляции [5–7]. По данным анализа последовательностей 16S рРНК [4, 6, 8, 9] и ITS [6], в число фототрофных симбионтов морских губок могут входить цианобактерии, динофлагелляты, зеленые, красные, бурые, диатомовые, эвгленовые, криптофитовые водоросли, кокколитофорида, а также α - и β -протеобактерии.

Спонгиофауна пресных водоемов насчитывает около 150 видов [10], но таксономическое и функциональное разнообразие микроорганизмов в со-

обществах пресноводных губок исследовано крайне мало. Как правило, пресноводные сообщества фильтрующих воду животных формируются про- и эукариотическими микроорганизмами, входящими в состав автотрофного пикопланктона. В таких озерах, как Байкал, Танганьика, Хубсугул, Тахо можно обнаружить пикоцианобактерии родов *Synechococcus* [11], *Cyanobium* [12, 13], а также *Prochlorococcus*-подобные цианобактерии [14]. Пикоэукариоты могут быть представлены *Chlorella*-подобными зелеными водорослями [11, 15, 16], коккоидными формами родов *Scenedesmus*, *Desmodesmus* [17] и *Choricystis* [18]. Среди микроводорослей прибрежной зоны оз. Байкал описаны бентосные формы диатомовых, принадлежащих родам *Hannaea*, *Gomphonema*, *Cymbella* и *Nitzschia* [19].

Из всего разнообразия фотосимбионтов в пресноводных экосистемах особо интересна эндемичная спонгиофауна оз. Байкал (сем. *Lubomirskiidae*), насчитывающая 14 видов губок [20]. На глубинах, допускающих проникновение света, в бентосных сообществах Байкала “фотосинтезирующие” губки (роды *Lubomirskia* и *Baikalospongia*) формируют сплошной зеленый ковер. В наших предыдущих работах показано, что сообщества байкальских губок отличаются по составу и разнообразию мик-

роорганизмов в той же степени, что и ассоциации морских губок [21–25]. На основе анализа клонок генов 16S рРНК и RubisCO установлено также, что фотосинтезирующие цианобактерии в микробных сообществах байкальских губок представлены довольно многочисленной группой, составляющей до 27% от суммы идентифицированных последовательностей [21, 24–26].

Ген белка D1 фотосистемы II (*psbA*), обнаруженный и у цианобактерий, и в хлоропластном геноме водорослей, широко используется как филогенетический маркер для изучения разнообразия фототрофных про- и эукариотических микроорганизмов в морских сообществах [27–29]. Белки D1 и D2 связывают все редокс-активные компоненты фотосистемы II, которая опосредует перенос электронов и протонов из воды, конечного донора электронов, к пулу пластохинонов [30].

В нашей работе впервые консервативный участок гена *psbA* использован в качестве молекулярного маркера разнообразия фототрофных микроорганизмов в сообществах двух образцов эндемичной губки *Baikalospongia intermedia* – типичного представителя байкальской спонгиофауны, а также во всем, окружающем губку, водном сообществе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы губок *B. intermedia* IK503 и *B. intermedia* IK506 собраны в августе 2013 г. в акватории Среднего Байкала (залив Улан-Хан) с глубины 3 м. Пробу воды (100 мл) отбирали непосредственно рядом с губкой и затем фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Merck, Millipore”, США). Таким образом, оседающие на фильтры водные микроорганизмы включают как пикопланктонную фракцию, так и нано- и микроорганизмы [31]. ДНК симбиотических и планктонных микроорганизмов выделяли с помощью набора “РибоСорб” (АмплиСенс, Россия). Для ПЦР использовали праймеры к высококонсервативному участку гена *psbA*: *psbA*-1F (5'-TAYCCNATYTGGAAGC-3') и *psbA*-2R (5'-TCRAGDGGGAARTTRTG-3') [32]. Условия амплификации: активация полимеразы (5 мин при 95°C); 35 циклов, включающих денатурацию ДНК (45 с при 95°C), отжиг праймеров (60 с при 56°C), и элонгацию (90 с при 72°C); финальная элонгация (10 мин при 72°C). ПЦР-фрагменты клонировали в векторе pTZ57R/T (“Fermentas”, США), после чего проводили трансформацию химически компетентных клеток *E. coli* XL1BL. Рекombинантные клоны, содержащие вставки ожидаемых размеров (около 800 п.н.), секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL (“Applied Biosystems”, США; “Синтол”, Россия). В общей сложности проанализировано 217 клонов.

Последовательности выравнивали и определяли их сходство (в процентах) при помощи модуля ClustalW программного пакета BioEdit 7.0 [33]. Полученные данные сравнивали с опубликованными ранее, для чего использовали программу BlastX сервера NCBI [34]. Для филогенетического анализа сравнивали последовательности, наиболее сходные с последовательностями, идентифицированными в нашей работе. Филогенетические деревья строили по методу максимального правдоподобия (ML, maximum likelihood), используя пакет программ Mega 5 [35]. Нуклеотидные последовательности депонированы в GenBank под номерами KU765130–KU765195.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты секвенирования трех клонок генов *psbA* свидетельствуют о широком разнообразии фототрофных микроорганизмов в микробиомах байкальских губок, а также в водном сообществе оз. Байкал. После удаления неспецифических вставок, в анализ включили 160 последовательностей. Виртуально транслированные аминокислотные последовательности, проявляющие 100%-ное сходство, полностью сходные, объединяли и рассматривали как уникальные. При использовании программы BlastX установлено, что все последовательности родственны генам белка D1 различных морских и пресноводных микроорганизмов. Сходство с ближайшими гомологами по аминокислотным последовательностям для разных фрагментов обнаруженных генов *psbA* составляет от 94 до 100%. Как показал филогенетический анализ, все последовательности можно распределить по двум большим группам: *psbA* прокариотических микроорганизмов, в том числе вирусные последовательности, и *psbA* эукариотических фототрофов (рисунки а, б).

В ДНК метагеномного сообщества губки *B. intermedia* BS506 обнаружено 17 уникальных последовательностей (из них 16 принадлежат прокариотическим микроорганизмам, и одна – эукариотической водоросли); в метагеномной ДНК *B. intermedia* BS503 – 18 фрагментов генов *psbA* (13 и 5 соответственно), в метагеномной ДНК водного микробиома – 32 последовательности (23 и 9) (рисунки а, б).

В группу прокариотических последовательностей гена *psbA* входят гены белка D1 пикоцианобактерий, а также вирусные последовательности (рисунок а). Присутствие вирусов (цианофагов) в анализируемой микробной фракции можно объяснить их ассоциацией с клетками водорослей (цианобактериями). Среди культивируемых гомологов в данной группе находятся штаммы цианобактерий родов *Synechococcus* и *Cyanobium*, а также цианофаги, с которыми представленные нами последовательности практически идентичны (99–100%). Ранее пикоцианобактерии порядка

Chroococcales, прежде всего представители рода *Synechococcus*, были найдены как в сообществах разных видов байкальских губок [21, 24–26], так и в планктонных сообществах оз. Байкал [36, 37].

На филогенетическом древе клада “Pro-1”, объединяет группу цианобактериальных (“Cyano-PsbA”) и вирусных (“Vir-PsbA”) генов *psbA*, обнаруженных как в сообществах губок, так и в водном микробиоме (рисунок а). “Цианобактериальная” ветвь сформирована последовательностями, родственными гену *psbA* пикоцианобактерии *Synechococcus* sp. RCC307. Данная группа довольно многочисленна (18 уникальных последовательностей), что свидетельствует о высоком разнообразии представителей рода *Synechococcus* в микробиомах байкальских губок и планктонном сообществе. Группа “Vir-PsbA” включает гены *psbA* некультивируемых морских вирусов (рисунок а). Известно, что в геноме многих цианофагов имеются функциональные гены, в том числе, гены фотосинтеза (*psbA*, *D*) и метаболизма углерода (*talC*, *zwf*, *gnd*, *cp12*), которые вирусы получили от цианобактерий путем горизонтального переноса [38]. Эти гены служат удобными маркерами для изучения коэволюционных взаимоотношений между фагом и его хозяином. В ряде работ показано, что гены *psbA* циановирусов, по сравнению с цианобактериями, характеризуются более низким содержанием GC (вследствие изменений в третьих позиции кодона в гене), и при филогенетическом анализе объединяются в отдельную кладу [39, 40]. Интересно, что большинство генов *psbA* микроорганизмов водного сообщества группируются между собой и формируют отдельные ветви как внутри группы “Cyano-PsbA”, так и “Vir-PsbA”. Таким образом, на примере клады “Pro-1” видно, что среди пикоцианобактерий (и циановирусов) имеются отдельные представители, характерные либо для сообщества губок, либо для водного микробиома.

Смешанная группа “Pro-2” образована преимущественно последовательностями *psbA* из микробных сообществ губок (из 15 ампликонов только два принадлежат микроорганизмам водной среды). Данная группа объединяет гены некультивируемых морских микроорганизмов, цианобактерий, некультивируемых вирусов, в том числе, — цианофагов (рисунок а). По-видимому, большинство фототрофных микроорганизмов, входящих в состав данной группы, получают благоприятные условия для развития именно в составе симбиотических сообществ губок и специфичны для них.

В отдельную группу “Pro-3” на филогенетическом древе объединяются последовательности, родственные известным цианобактериальным штаммам. Например, клон 35-PsbA-ІК506 практически идентичен (99% сходства) гену *psbA* пикоцианобактерией *Cyanobium gracile*, а клон 14-PsbA-

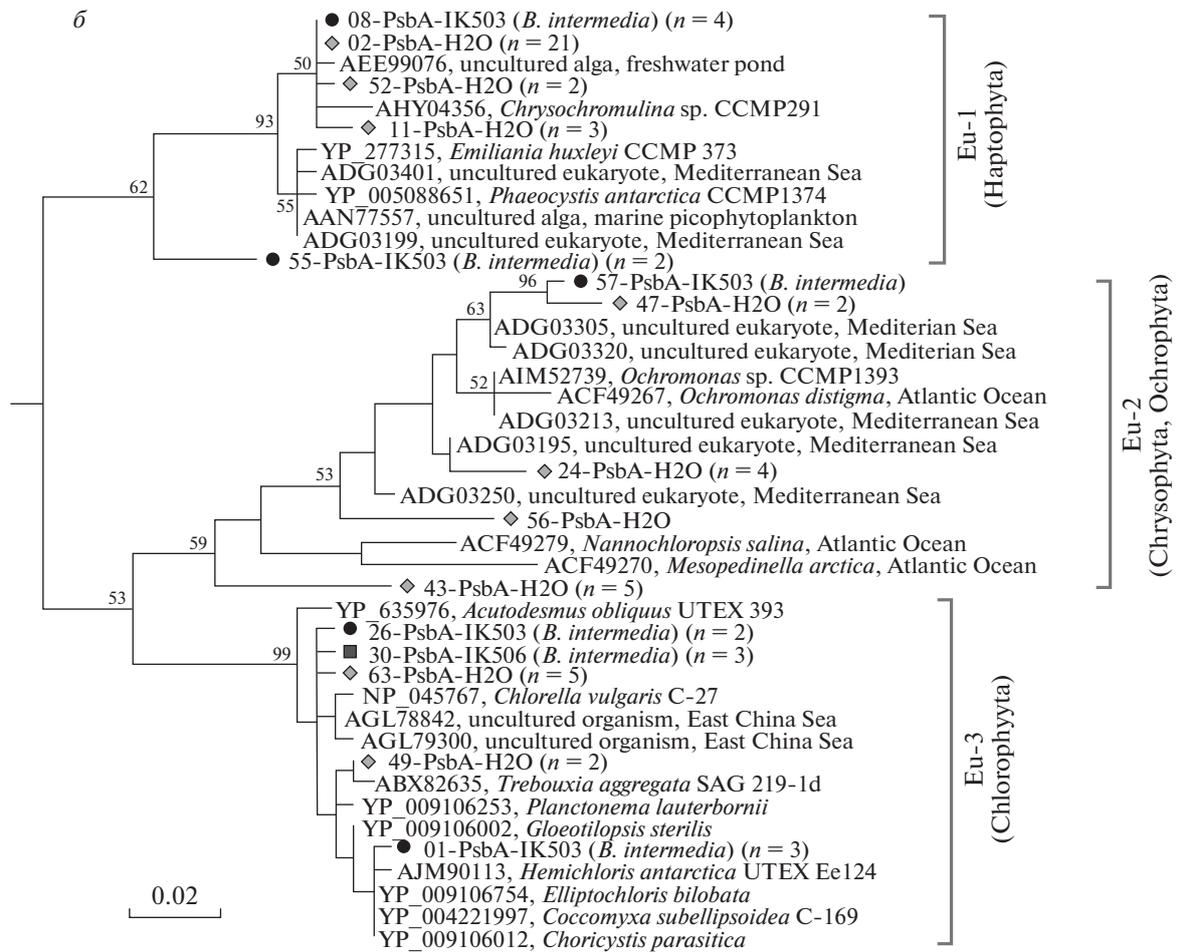
ІК506 на 100% — гену *psbA* *Synechococcus* sp. WH5701. В группу ближайших гомологов данных последовательностей входят несколько последовательностей *psbA* из водных и губочных сообществ, что свидетельствует о присутствии данных генотипов цианобактерий в сообществах байкальских губок и байкальском фитопланктоне.

Интересно, что в группу прокариотических последовательностей гена *psbA* входят последовательности белка D1 раковинной амёбы рода *Paulinella* (отряд Testacea, филум Cercozoa). Этот микроорганизм обладает *Synechococcus/Prochlorococcus*-подобным хроматофором, который он приобрел в процессе эволюции в результате эндосимбиотических отношений с цианобактериями рода *Synechococcus*. Хроматофор раковинной амёбы филогенетически отличается от пластид основной эукариотической линии и является примером повторного возникновения пластид. Его эволюционный возраст составляет всего 60 млн. лет, тогда как хлоропласты эукариот возникли около 1 млрд. лет назад в результате захвата древней цианобактерии предшественником эукариотической клетки [41]. Этот факт может свидетельствовать о присутствии представителей рода *Paulinella* в водных сообществах оз. Байкал и микробиомах байкальских губок.

В микробиомах губок и водном сообществе найдены последовательности *psbA* эукариотических микроорганизмов. При этом девять из 16 уникальных ампликонов обнаружены в водном микробиоме. На филогенетическом древе идентифицированные последовательности вместе с ближайшими гомологами из GenBank формируют три четко выраженные клады (рисунок б).

Клада “Eu-1” объединяет последовательности микроорганизмов губок (клоны 08-, 55-PsbA-ІК503) и планктона (02-, 11-, 52-PsbA-H2O) — вместе с генами некультивируемых морских и пресноводных эукариот, а также культивируемыми клонами гаптофитовых водорослей (отд. Nartophyta) (рисунок б). Представители отдела Nartophyta — фототрофные жгутиконосцы, широко распространенные в составе наннопланктона морских и пресноводных сообществ [42]. На филогенетическом древе среди ближайших гомологов идентифицированных генов находится водоросль *Chrysochromulina* sp. ССМР291 (рисунок б). Один из наиболее распространенных представителей рода *Chrysochromulina* (космополитный вид *Chrysochromulina parva*) достигает массового развития в сообществах континентальных озер (таких как оз. Танганьика, оз. Кенерет, оз. Ланао) [43, 44]. Этот стенотермный холодолюбивый вид доминировал также в годы в летнем фитопланктоне оз. Байкал [45]. Последовательности морских микроорганизмов формируют внутри клады “Eu-1” отдельную ветвь. Среди них одноклеточ-





a – Филогенетическое дерево последовательностей генов *psbA* (248 аминокислот) прокариотических микроорганизмов, ассоциированных с байкальской губкой *B. intermedia* и окружающей водной средой. Последовательности, определенные в данной работе, отмечены значками “круг”, “квадрат”, “ромб”. Опубликованные ранее последовательности приводятся с номерами доступа в GenBank. Числа в узлах дерева соответствуют величинам бутстреп-поддержек. Масштаб эволюционных расстояний соответствует двум заменам на каждые 100 п.н. *б* – Филогенетическое дерево последовательностей генов *psbA* эукариотических микроорганизмов, ассоциированных с байкальской губкой *B. intermedia* и окружающей водной средой.

ная водоросль *Phaeocystis antarctica*, широко распространенная в морях Южного полушария и на поверхности ледников, где ее популяция достигает массового развития и образует плавающие колонии, состоящие из сотен клеток, соединенных полисахаридным матриксом [46]. Другая микроскопическая водоросль, входящая в данную группу, *Emiliania huxleyi*, – одноклеточная кокколитофорида, формирующая на поверхности клеток оболочку из кальциевых пластинок (CaCO_3). Эта водоросль – основной фиксатор карбонатов (следовательно, и атмосферного CO_2) и один из главных составляющих донных осадков в мировом океане [47, 48].

Четыре последовательности гена *psbA* из водного сообщества и одна последовательность из сообщества губки (*B. intermedia* IK503) группируется в кладу “Eu-2”, куда входят также последова-

тельности некультивируемых эукариот, хризофитовой водоросли рода *Ochromonas* (отд. Chrysophyta), а также разножгутиковых *Nannochloropsis salina* и *Mesopedinella arctica* (отд. Heterokonta) (рисунок *б*). Виды рода *Ochromonas* – одноклеточные жгутиконосцы, миксотрофы, обитающие в морских и пресноводных водоемах. Эти окрашенные в золотистый цвет водоросли часто обнаруживаются в планктоне и нейстоне олиготрофных озер, в том числе в условиях низкой освещенности [49], в которых они успешно развиваются благодаря способности совмещать процесс фотосинтеза и осмотическое потребление органических компонентов (фагоцитоз) [50]. Представители рода *Nannochloropsis* – первичные продуценты в составе планктонных микроорганизмов и способны адаптироваться и успешно развиваться при низких температурах [51, 52]. Эти однокле-

точные микроводоросли (2–3 мкм), обладают необычным фотосинтетическим аппаратом, который содержит только хлорофилл *a* [53]. Ранее вид *Nannochloropsis limnetica* обнаруживался в фитопланктонных пробах из оз. Байкал [54], в течение всего года. Последовательности генов поликетидсинтаз *Nannochloropsis gaditana* также обнаруживаются в метагеномном сообществе байкальской губки *Swartschewskia papyracea* [25]. По-видимому, представители рода *Nannochloropsis* – типичные эукариотические фототрофы в микробиомах байкальских губок.

Отдельная клада “Eu-3”, объединяет фрагменты генов *psbA* водных и губочных микроорганизмов, а также последовательности разнообразных культивируемых представителей отдела Chlorophyta (рисунок б). Среди них одноклеточные (*Trebouxia aggregata*, *Chlorella vulgaris*, *Elliptochloris bilobata*, *Hemichloris antarctica*, *Coccomyxa subellipsoidea*, *Choricystis parasitica*) и нитчатые (*Gloeotilopsis* sp., *Planctonema lauterbornii*) водоросли; планктонные виды (*Gloeotilopsis sterilis*, *Acutodesmus obliquus*, *Choricystis parasitica*, *Chlorella vulgaris*) и фотобионты лишайников (*Elliptochloris* sp., *Trebouxia* sp.), а также антарктические психротолерантные виды, развитие которых происходит в толще снега (*Coccomyxa subellipsoidea*, *Hemichloris antarctica*). При этом, такие представители зеленых водорослей, как *Choricystis minor*, *Chlorella* sp., ранее также обнаруживались в водном сообществе оз. Байкал [18].

В настоящей работе мы впервые применили ген белка D1 фотосистемы II (*psbA*) в качестве молекулярного маркера для исследования разнообразия окислительных фототрофов в составе симбиотической микрофлоры беспозвоночных животных пресноводных экосистем. В микробных сообществах губок, населяющих бентосные сообщества оз. Байкал, найдены такие таксономические группы микроорганизмов-фотосинтетиков, как цианобактерии (филум Cyanobacteria), зеленые (отд. Chlorophyta), разножгутиковые (отд. Heterokonta), гаптофитовые (отд. Haptophyta), охрофитовые (отд. Ochrophyta) водоросли, а также цианофаги. Интересно, что последовательность гена белка D1 раковинной амёбы рода *Paulinella* находится в числе ближайших гомологов обнаруженных нами последовательностей; это указывает на присутствие данного микроорганизма в исследуемых сообществах.

Данные анализа разнообразия последовательностей *psbA* в микробных ассоциациях байкальских губок согласуются с результатами исследований разнообразия прокариот в сообществах губок, полученными с применением классических маркеров (16S рРНК, RubisCO) [21–26]; это указывает на широкое многообразие пикоцианобактерий в исследуемых сообществах. Кроме того, в работе показано, что маркер *psbA* пригоден для

изучения таксономического разнообразия эукариотических микроорганизмов, исследований которого в сообществах байкальских губок до настоящего времени не проводили. Мы полагаем, что функциональный ген *psbA* может быть использован в дальнейшем для изучения разнообразия про- и эукариотических фототрофов в байкальских сообществах как независимо, так и в комплексе с классическими молекулярными маркерами (16S, 18S рРНК и другими).

Работа выполнена в рамках государственной темы VI.50.1.4. “Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений” (0345-2016-0002) при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-00527-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gregg W.W., Conkright M.E., Ginoux P., O'Reilly J.E., Casey N.W. (2003) Ocean primary production and climate: Global decadal changes. *Geophys. Res. Lett.* **30**, doi 10.1029/2003GL016889
2. Egan S., Thomas T. (2015) Microbial symbiosis of marine sessile hosts – diversity, function and applications. *Front. Microbiol.* doi 10.3389/fmicb.2015.00585
3. Thompson J.R., Rivera H.E., Closek C.J., Medina M. (2015) Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **4**, doi 10.3389/fcimb.2014.00176
4. Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. (2007). Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**, 295–347.
5. Ribes M., Jiménez E., Yahel G., López-Sendino P., Diez B., Massana R., Sharp J.H., Coma R. (2012) Functional convergence of microbes associated with temperate marine sponge. *Environ. Microbiol.* **14**, 1224–1239.
6. Erwin P.M., Thacker R.W. (2008) Phototrophic nutrition and symbiont diversity of two Caribbean sponge-cyanobacteria content of novel cyanobacterial symbionts in temperate sponges. *Microb. Ecol.* **64**, 771–783.
7. Erwin P.M., López-Legentil S., Turon X. (2012) Ultrastructure, molecular phylogenetics, and chlorophyll a content of novel cyanobacterial symbionts in temperate sponges. *Microb. Ecol.* **64**, 771–783.
8. Venn A.A., Loram J.E., Douglas A.E. (2008) Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* **59**, 1069–1080.
9. Lemloh M.-L., Fromont J., Brümmer F., Usher K.L. (2009) Diversity and abundance of photosynthetic sponges in temperate Western Australia. *BMC Ecology.* **9**, doi 10.1186/1472-6785-9-4
10. Manconi R., Pronzato R. (2002) Suborder *Spongillina* subord. nov.: freshwater sponges. In: *Systema Porifera: a Guide to the Classification of Sponges*. Eds. Hooper N.J.A., van Soest R.W.M. New York: Kluwer Academic/Plenum Publ., pp. 921–1019.

11. Winder M. (2009) Photosynthetic picoplankton dynamics in Lake Tahoe: temporal and spatial niche partitioning among prokaryotic and eukaryotic cells. *J. Plankton. Res.* **31**, 1307–1320.
12. Ivanikova N.V., Popels L.C., McKay R.M., Bullerjahn G.S. (2007) Lake Superior supports novel clusters of cyanobacterial picoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4055–4065.
13. Белых О.И., Тихонова И.В., Сороковикова Е.Г., Щербакова Т.А., Курейшевич А.В. (2011) Пикопланктонные Суанорокарыота родов *Synechococcus* Nageli и *Synechium* Rippka et Cohen-Baz. из озера Байкал (Россия). *Альгология*. **21**, 36–51.
14. Corzo A., Jimenez-Gomez F., Gordillo F.J.L., Garcia-Ruiz R., Niell F.X. (1999) *Synechococcus* and *Prochlorococcus*-like populations detected by flow cytometry in a eutrophic reservoir in summer. *J. Plankton Res.* **21**, 1575–1581.
15. Weisse T. (1993) Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. In: *Advances in Microbial Ecology*, vol. 13. Ed. Jones J.G. New York: Plenum Press, pp. 327–370.
16. Stomp M., Huismans J., Stal L.J., Matthijs H.C.P. (2007) Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. *ISME J.* **1**, 271–282.
17. Soylu E.N., Gönüloğlu A. (2012) Morphological and 18S rRNA analysis of coccoid green algae isolated from lakes of Kızılırmak Delta. *Turk. J. Biol.* **36**, 247–254.
18. Belykh O.I., Semenova E.A., Kuznedelov K.D., Zai-ka E.I., Guselnikova N.E. (2000) A eukaryotic alga from picoplankton of Lake Baikal: morphology, ultrastructure and rDNA sequence data. *Hydrobiologia*. **435**, 83–90.
19. Бондаренко Н.А., Белых О.И., Логачева Н.Ф., Тихонова И.В., Волкова Е.А. (2012) Микроводоросли прибрежной зоны озера Байкал. *Известия Иркутского гос. ун-та, серия “Биология. Экология”*. **5**, 88–102.
20. Ефремова С.М. (2001) Губки (Porifera). В кн.: *Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна*. 1. Книга 1. Новосибирск: Наука, 177–190.
21. Калюжная О.В., Кривич А.А., Ицкович В.Б. (2012) Разнообразие генов 16S рРНК в метагеномном сообществе пресноводной губки *Lubomirskia baicalensis*. *Генетика*. **48**, 1003–1006.
22. Гладких А.С., Калюжная О.В., Белых О.И., Анн Т.С., Парфенова В.В. (2014) Анализ бактериального сообщества двух эндемичных видов губок из озера Байкал. *Микробиология*. **83**, 682–693.
23. Калюжная О.В., Ицкович В.Б. (2014) Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с глубоководной губкой *Baikalospongia intermedia*. *Генетика*. **50**, 765–776.
24. Калюжная О.В., Ицкович В.Б. (2015) Влияние обесцвечивания байкальской губки на таксономический состав симбиотических микроорганизмов. *Генетика*. **51**, 1335–1340.
25. Калюжная О.В., Ицкович В.Б. (2016) Особенности микробного разнообразия и спектра генов поликетидсинтаз в сообществе эндемичной байкальской губки *Swartschewskia papyracea*. *Генетика*. **52**, 47–58.
26. Kulakova N.V., Denikina N.N., Belikov S.I. (2014) Diversity of bacterial photosymbionts in *Lubomirskiidae* sponges from Lake Baikal. *Int. J. Biodiversity*, doi 10.1155/2014/152097
27. Zeidner G., Preston C.M., Delong E.F., Massana R., Post A.F., Scanlan D.J., Bèjà O. (2003) Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by *psbA* analyses. *Environ. Microbiol.* **5**, 212–216.
28. Zeidner G., Bèjà O. (2005) Community-level analysis of phototrophy: *psbA* gene diversity. *Methods Enzymol.* **397**, 372–380.
29. Zheng Q., Jiao N., Zhang R., Chen F., Suttle C.A. (2013) Prevalence of *psbA*-containing cyanobacterial podoviruses in the ocean. *Sci. Rep.* **3**, doi 10.1038/srep03207
30. Mulo P., Sakurai I., Aro E.-M. (2012) Strategies for *psbA* gene expression in cyanobacteria, green algae and higher plants: from transcription to PSII repair. *Biochem. Biophys. Acta.* **1817**, 247–257.
31. Михеева Т.М. (1988) Проблемы изучения фитопланктона: нанофитопланктон (дефиниция, фракционирование и значимость в первичной продукции). *Гидробиол. журн.* **24**, 3–21.
32. Man-Aharonovich D., Alon Philofof A., Kirkup B.C., Le Gall F., Yogeve T., Berman-Frank I., Polz M.F., Vaulot D., Bèjà O. (2010) Diversity of active marine picoeukaryotes in the Eastern Mediterranean Sea unveiled using photosystem-II *psbA* transcripts. *ISME J.* **4**, 1044–1052.
33. Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* **41**, 95–98.
34. Altschul S.F., Warren G., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
35. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007) MEGA4: molecular genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 1596–1599.
36. Белых О.И., Помазкина Г.В., Тихонова И.В., Томберг И.В. (2007) Характеристика летнего фитопланктона и автотрофного пикопланктона озера Байкал в 2005 году. *Альгология*. **17**, 380–396.
37. Парфенова В.В., Гладких А.С., Белых О.И. (2013) Сравнительный анализ биоразнообразия бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал. *Микробиология*. **82**, 94–105.
38. Zheng Q., Jiao N., Zhang R., Wei J., Zhang F. (2014) The evolutionary divergence of *psbA* gene in *Synechococcus* and their myoviruses in the East China Sea. *PLoS ONE*. **9**, e86644. doi 10.1371/journal.pone.0086644
39. Sullivan M.B., Lindell D., Lee J.A., Thompson L.R., Bielawski J.P., Chisholm SW. (2006) Prevalence and evolution of core photosystem II genes in marine cyanobacterial viruses and their hosts. *PLoS Biology*. **4**, e234.
40. Zeidner G., Bielawski J.P., Shmoish M., Scanlan D.J., Sabehi G., Bèjà O. (2005) Potential photosynthesis gene recombination between *Prochlorococcus* and *Synechococcus* via viral intermediates. *Environ. Microbiol.* **7**, 1505–1513.

41. Marin B., Nowack E.C., Glöckner G., Melkonian M. (2007) The ancestor of the *Paulinella* chromatophore obtained a carboxysomal operon by horizontal gene transfer from a *Nitrococcus*-like γ -proteobacterium. *BMC Evolut. Biol.* **85**, doi 10.1186/1471-2148-7-85
42. Moon-van der Staay S.Y., van der Staay G.W.M., Guillou L., Vaultot D., Claustre H., Medlin L.K. (2000) Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.* **45**, 98–109.
43. Pollinger U. (1990) Effects of latitude on phytoplankton composition and abundance in large lakes. In: *Large Lakes. Ecological Structure and Function*. Eds Tilzer M.M., Serruya C. Berlin: Springer-Verlag, pp. 368–403.
44. Романов Р.Е. (2008) Нартопфита – новый отдел для альгофлоры Западной Сибири. *Растительный мир Азиатской России*. 2, 9–11.
45. Izmet'eva L.R., Silova E.A., Litchman E. (2011) Long-term dynamics of Lake Baikal pelagic phytoplankton under climate change. *Inland Water Biol.* **4**, 301–307.
46. van Leeuwe M.A., Visser R. J.W., Stefels J. (2014) The pigment composition of *Phaeocystis antarctica* (Haptophyceae) under various conditions of light, temperature, salinity, and iron. *J. Phycol.* **50**, 1070–1080.
47. Paasche E. (2001) A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia*. **40**, 503–529.
48. Frada M., Probert I., Allen M.J., Wilson W.H., de Vargas C. (2008) The “Cheshire Cat” escape strategy of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in response to viral infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **105**, 15944–15949.
49. Охупкин А.Г., Юлова Г.А. 2010. *Основы альгологии*. Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского государственного университета.
50. Katechakis A., Stibor H. (2006) The mixotroph *Ochromonas tuberculata* may invade and suppress specialist phago- and phototroph plankton communities depending on nutrient conditions. *Oecologia*. **148**, 692–701.
51. Konga W., Reamb D.C., Priscus J.C., Morgan-Kiss R.M. (2012) Diversity and Expression of RubisCO genes in a perennially ice-covered Antarctic lake during the polar night transition. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4358–4366.
52. Fawley K.P., Fawley M.W. (2007) Observations on the diversity and ecology of freshwater *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae), with descriptions of new taxa. *Protist*. **158**, 325–336.
53. Tamburic B., Szaby M., Tran N.-A.T., Larkum A.W.D., Suggett D.J., Ralph P.J. (2014) Action spectra of oxygen production and chlorophyll a fluorescence in the green microalga *Nannochloropsis oculata*. *Bioresour. Technol.* **169**, 320–327.
54. Fietz S., Bleib W., Hepperle D., Koppitz H., Krienitz L., Nicklisch N. (2005) First record of *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) in the autotrophic picoplankton from Lake Baikal. *J. Phycol.* **41**, 780–790.

Phototrophic Microorganisms in Symbiotic Communities of Baikalian Sponges: Diversity of *psbA* Gene Sequences (Protein D1 of Photosystem II)

O. V. Kaluzhnaya*, V. B. Itskovich

Limnological Institute, Siberian Branch Russian Academy of Science, Irkutsk, 664033 Russia

**e-mail: kaluzhnaya.oks@gmail.com*

Here we describe utility of *psbA* gene fragment encoding major protein of photosystem II (D1 protein) in the to study of the diversity of phototrophic microorganisms in symbiotic communities of freshwater invertebrates. We present the results of the study of microbial associations accompanying endemic Baikal sponge *Baikalospongia intermedia*, as well as the water microbial community surrounding the sponge. In studied microbiomes, *psbA* gene sequence analysis demonstrated the presence of a variety of photosynthetic groups, including Cyanobacteria, Chlorophyta, Heterokonta, Haptophyta, Ochrophyta algae, as well as cyanophages. In total, microbial communities of endemic sponges *B. intermedia* were shown to contain 35 unique *psbA* gene sequences, while in water community that surrounds the sponge 32 unique *psbA* sequences were detected. These data indicate involvement of sponge's symbiotic communities in the accumulation of primary production and the carbon cycle in ecosystem of Lake Baikal.

Keywords: Lake Baikal, freshwater sponges, *Baikalospongia intermedia*, symbiotic community gen *psbA*, phototrophic microorganisms