

RESEARCH ARTICLE

UDC 574.589

Cultivated bacteria from the sub-ice algae-bacterial communities of Lake Baikal

M.V. Bashenkhayeva, Yu.R. Zakharova

*Limnological Institute of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*
maria.bashenkhayeva@gmail.com, zakharova@lin.irk.ru

A collection of pure cultures isolated from the sub-ice algae-bacterial communities inhabiting the lower ice surface of Lake Baikal was obtained. The differences in morphology of the cultured bacteria and their enzymatic activities were revealed by the methods of classical microbiology. The taxonomic affiliation of several cultures was determined by the 16S rRNA gene sequencing. They belong to the genera *Pseudomonas putida*, *P. psychrophila*, *Methylobacterium extorquens*, *Rhodococcus aerolatus*, *Brevundimonas aurantiaca*, *B. vesicularis*, *Sphingomonas subarctica*, *Roseomonas frigidaqua*, and *Janthinobacterium lividum*. These taxa are adapted to low-temperature environments.

Key words: Lake Baikal; sub-ice communities; microalgae; bacteria; enzymatic activity; 16S rRNA sequencing

Культивируемые бактерии из подледных альго-бактериальных сообществ озера Байкал

М.В. Башенхаева, Ю.Р. Захарова

*Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук,
Иркутск, Россия*
maria.bashenkhayeva@gmail.com, zakharova@lin.irk.ru

Получена коллекция чистых культур, изолированных из подледных альго-бактериальных сообществ, обитающих на нижней поверхности льда озера Байкал. Методами классической микробиологии показано различие в морфологии культивируемых бактерий и в их ферментативной активности. С помощью секвенирования гена 16S рРНК была определена таксономическая принадлежность нескольких чистых культур, которые были отнесены к *Pseudomonas putida*, *P. psychrophila*, *Methylobacterium extorquens*, *Rhodococcus aerolatus*, *Brevundimonas aurantiaca*, *B. vesicularis*, *Sphingomonas subarctica*, *Roseomonas frigidaqua* и *Janthinobacterium lividum*. Данные таксоны адаптированы к выживанию при низких температурах.

Ключевые слова: озеро Байкал; подледные сообщества; микроводоросли; бактерии; ферментативная активность; секвенирование гена 16S рРНК

Введение

Подо льдом в водных экосистемах на границе раздела фаз «вода-лед» формируются особые сообщества, состоящие из микроводорослей, простейших и бактерий. Условия окружающей среды данной экологической ниши отличаются от условий периода открытой воды и определяются сочетанием нескольких факторов: толщиной льда и снежного покрова, интенсивностью солнечной радиации, концентрацией биогенных элементов и температурой воды (Cota et al., 1991).

Ледовый период на озере Байкал длится от 4 до 6 месяцев (Galazy, 1993), и подледное цветение – один из наиболее значимых периодов развития байкальского фитопланктона, который определяет основу первичной продукции озера. Байкал характеризуется массовым подледным цветением различных микроводорослей: диатомовых *Aulacoseira baicalensis* (K. Meyer) Simonsen (Bondarenko et al., 2006; Jewson et al., 2009; Jewson, Granin, 2015), *A. islandica* (O. Müll.) Simonsen (Jewson et al., 2008; Bashenkhaeva et al., 2015); динофлагеллят *Gymnodinium baicalense* Antip. (Obolkina et al., 2000; Bashenkhaeva et al., 2017) и *Peridinium baicalense* Kiss. et Zwetkoff (Pomazkina et al., 2010) и хризодитовой *Dinobryon cylindricum* (Votintsev et al., 1975). Подо льдом биомасса фитопланктона в фотическом слое воды может достигать 1 г/м³ (Popovskaya, 1977), что приводит к увеличению общей концентрации органических веществ (Votintsev et al., 1975) и повышению численности гетеротрофных бактерий (Straškrábová et al., 2005).

Бактерии играют важную роль в круговороте веществ в водных экосистемах, они потребляют растворенное органическое вещество, синтезируемое продуцентами, и передают энергию на следующие трофические уровни (Azam et al., 1983; Azam and Malfatti, 2007). Они обитают и успешно размножаются в условиях, при которых другие организмы либо погибают, либо впадают в анабиоз. У психрофильных бактерий выработаны определенные механизмы для адаптации к холодным условиям среды обитания. Так, в составе мембранных липидов психрофильных бактерий преобладают ненасыщенные жирные кислоты (De Maayer et al., 2014), что позволяет поддерживать высокую проницаемость мембраны. Известно, что ферменты психрофилов обладают низкой температурой активации по сравнению с ферментами мезофильных бактерий (Feller et al., 1996; Cavicchioli et al., 2002), что способствует нормальному протеканию биохимических реакций при низких температурах. Кроме того, психрофильные бактерии способны синтезировать специализированные защитные белки: белки холодового шока, которые препятствуют сворачиванию матричной РНК при низких температурах, облегчая процесс дальнейшего синтеза белка (Hébraud, Potier, 1999), и антифризные белки, ингибирующие рост кристаллов льда и понижающие точку замерзания внутренней жидкости (Gilbert et al., 2004).

Исследование свойств психрофильных бактерий возможно только на чистых изолированных из природы культурах, поэтому целью данной работы являлось получение культур бактерий из альго-бактериальных сообществ, обитающих на границе раздела фаз «вода-лед» озера Байкал, изучение их свойств и таксономической принадлежности.

Материалы и методы исследований

Отбор проб. Пробы воды с видимыми обрастаниями микроводорослей на нижней границе льда были отобраны в период с марта по апрель в 2011 и 2015 гг. в Южном Байкале в районе поселка Большие Коты (БК) в литоральной зоне (ЛЗ) на расстоянии 50–80 м от берега, в склоновой зоне (СЗ) на расстоянии 200 м от берега и в глубоководной зоне (ГЗ) в 1000 м от берега. В марте 2016 г. пробы отобраны в Среднем Байкале на станциях «вход» (пролив Ольхонские ворота), «центр» (середина пролива) и «выход» (напротив мыса Хобой) из пролива Малое Море (ММ) (рис. 1). Отбор проб воды с нижней поверхности льда проводили аквалангисты при помощи шприцов (рис. 2).

Культивирование бактерий. Из сообществ с доминированием диатомей бактерии культивировали на диатомовом агаре (ДА) по методике, предложенной ранее (Zakharova et al., 2010), и на рыбо-пептонном агаре, разбавленном в 10 раз (РПА:10), для учета широкого спектра органотрофных бактерий, по ранее опубликованной методике (Gorbenko et al., 1992). Посевы выполняли глубинным методом в 3-х повторностях, культивировали при температуре 25 °С и при 4 °С для выявления психрофилов. Учет количества колоний и выделение чистых культур бактерий проводили согласно общепринятым методикам. Окрашивание по Граму (Netrusov et al., 2005) и окрашивание флуорохромным красителем ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндо́л) (Sigma-Aldrich, США) (Coleman, 1980) проводили для всех чистых культур бактерий. Для анализа образцов, окрашенных по Граму, использовали световой микроскоп Axiostar Plus (Zeiss, Германия), для окрашенных ДАФИ – инвертированный эпифлуоресцентный микроскоп Axiovert 200 (Zeiss, Germany) с ультрафиолетовой лампой HBO 50W/AC ASRAM при спектре возбуждения 365 нм при увеличении ×1000 с иммерсионным маслом.

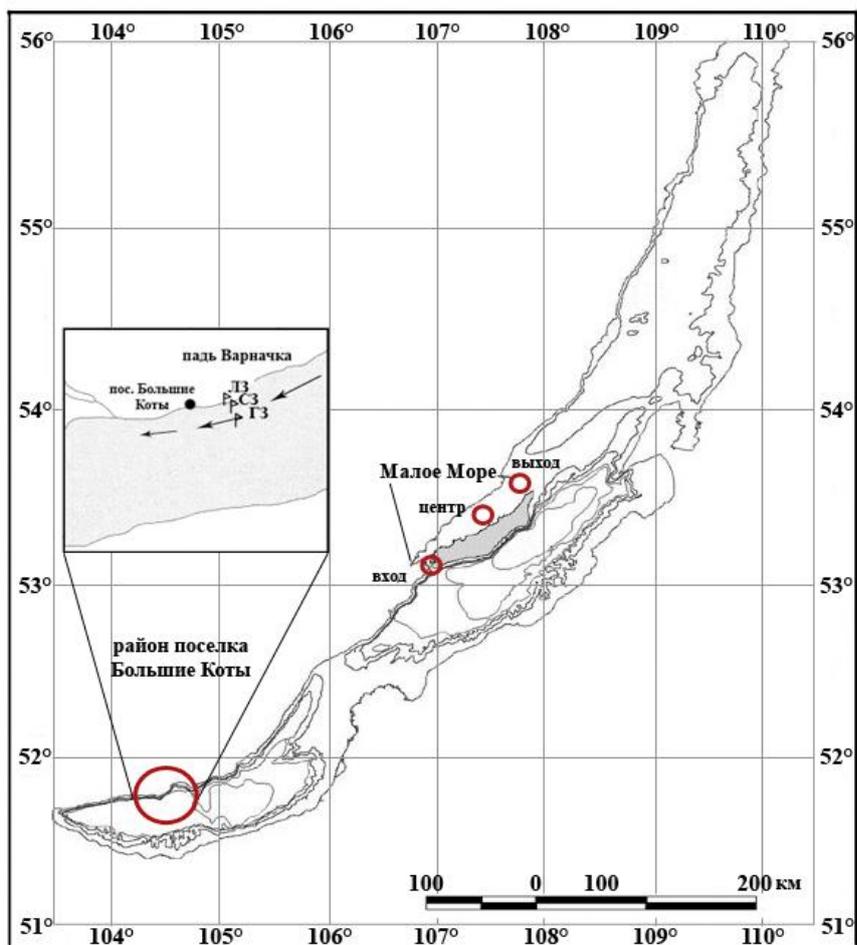


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб в озере Байкал:

ЛЗ – литоральная зона, СЗ – склоновая зона, ГЗ – глубоководная зона, стрелками указано направление подледных течений



Рис.2. Отбор проб подледных сообществ аквалангистом

Определение ферментативной активности. Для определения ферментативной активности использовали специализированные среды, содержащие в своем составе крахмал (амилолитическая активность), желатин и казеин (протеолитическая активность) и фосфолипазу (фосфолипазная активность) (Netrusov et al., 2005).

Выделение ДНК, амплификация гена 16S рРНК и секвенирование. Установление таксономической принадлежности изолятов проводили молекулярно-биологическими методами на основе анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК. Для выделения ДНК биомассу бактерий собирали со скошенного агара в 1 мл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0; 1 мМ ЭДТА), далее использовали метод фенол-хлороформной экстракции (Marmur, 1961) с некоторой модификацией (Bashenkhaeva et al., 2015). Амплификацию гена 16S рРНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами 27F и 1350R. Реакционная смесь (20 мкл) содержала: ПЦР-смесь-2-red (конечные концентрации: 1×ПЦР-буфер; 0,1 ед./мкл Taq-ДНК полимеразы; 2,2 мМ Mg²⁺; крезол красный); 0,2 мМ 10×dNTP-mix; по 0,1 мкМ соответствующих праймеров: 27F (AGAGTTTGATCATGGCTCAG) и 500L (CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA); H₂O стерильная; 1 мкл ДНК в качестве матрицы. Амплификацию проводили в автоматическом амплификаторе «БИС» М-111 (БИС-Н, Новосибирск) в следующем режиме: 94 °С – 2'; 94 °С – 30", 55 °С – 40", 72 °С – 50" – 25 циклов; 72 °С – 2'. Полученные продукты реакции анализировали в 1 %-ном агарозном геле. Секвенирование полученных образцов по методу Сэнгера проводили с использованием праймеров 27F, 500F и BigDye V 3.1 Terminator Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, ABI) на ABI 3130XL Genetic Analyser в ЦКП «Геномика» (Новосибирск).

Анализ данных секвенирования. Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью программ Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, США) и BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Поиск гомологичных последовательностей проводили, используя базу данных GenBank, с помощью программы BLASTN. Филогенетическое дерево построено с использованием метода объединения ближайших соседей (neighbor-joining) на основе алгоритма Kimura two-parameters в программе MEGA версия 6 (Tamura et al., 2013).

Результаты и их обсуждение

В период исследований гидрофизические параметры, определяющие условия среды подледных сообществ, варьировали: заснеженность льда – от 1 до 100 %, толщина снежного покрова – от 0,5 до 5 см, толщина льда – от 0,58 до 0,86 м. Температура подо льдом была от 0 до 1 °С (табл. 1).

Таблица 1. Гидрофизические параметры и состав доминирующих видов микроводорослей подледных сообществ

№	Станция	Дата	Т воды на разделе фаз вода-лед, °С	Заснеженность, %	Толщина снежного покрова, см	Толщина льда, м	Виды
1*	БК_ЛЗ	03.03.2011	0-1	100	3-5	0,65	<i>G. baicalense</i>
2*	БК_СЗ	03.03.2011	0-1	100	3-5	0,75	<i>G. baicalense</i>
3*	БК_ГЗ	03.03.2011	0-1	90	1-5	0,82	<i>A. baicalensis</i> , <i>A. islandica</i>
4*	БК_ЛЗ	18.03.2011	0-1	100	5	0,7	<i>G. baicalense</i>
5*	БК_СЗ	18.03.2011	0-1	100	5	0,78	<i>G. baicalense</i>
6*	БК_ГЗ	18.03.2011	0-1	98	3-5	0,84	<i>A. baicalensis</i> , <i>A. islandica</i>
7*	БК_ЛЗ	01.04.2011	0-1	100	5	0,72	<i>P. baicalense</i> , <i>P. euryceps</i>
8*	БК_СЗ	01.04.2011	0-1	100	5	0,79	<i>G. baicalense</i>
9*	БК_ГЗ	01.04.2011	0-1	80	3-5	0,86	<i>Chlorella</i> sp.
10	БК_ЛЗ	25.03.2015	0,1	90	1-2	0,58	<i>Chlorella</i> sp., <i>Monoraphidium griffithii</i>
11	БК_СЗ	25.03.2015	0,1	60	1	0,61	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>M. griffithii</i>
12	БК_ГЗ	25.03.2015	0,1	50	1	0,62	<i>Ch. vulgaris</i> , <i>M. griffithii</i>
13	ММ «вход»	20.03.2016	н.д.	1	0,5	0,7	<i>G. baicalense</i>
14	ММ «центр»	19.03.2016	н.д.	1	0,5	0,7	<i>G. baicalense</i>
15	ММ «выход»	19.03.2016	н.д.	1	0,5	0,69	<i>Synedra acus</i> и зелёные водоросли

Примечание: * по: Bashenkhaeva et al., 2015; н.д. – нет данных.

В подледных сообществах в разные годы развивались разные виды микроводорослей. В пробах, отобранных вблизи поселка Большие Коты в марте 2011 г., в сообществах ЛЗ и СЗ доминировали динофлагелляты *Gymnodinium baicalense*, в ГЗ – диатомеи *Aulacoseira baicalensis*, *A. islandica*. В апреле в ЛЗ преобладали динофлагелляты *Peridinium baicalense* и *P. euryseps*; в СЗ – *G. baicalense*, а в ГЗ – зелёные водоросли *Chlorella* sp. (Bashenkhaeva et al., 2015). В 2015 г. на всех станциях доминировали зелёные водоросли родов *Chlorella* sp. и *Monoraphidium griffithii*. В сообществах Малого Моря в 2016 г. на станции «вход» и «центр» доминировали динофлагелляты *G. baicalense*; на станции «выход» доминировали диатомеи *Synedra acus* и зелёные водоросли (рис. 3, табл. 1).

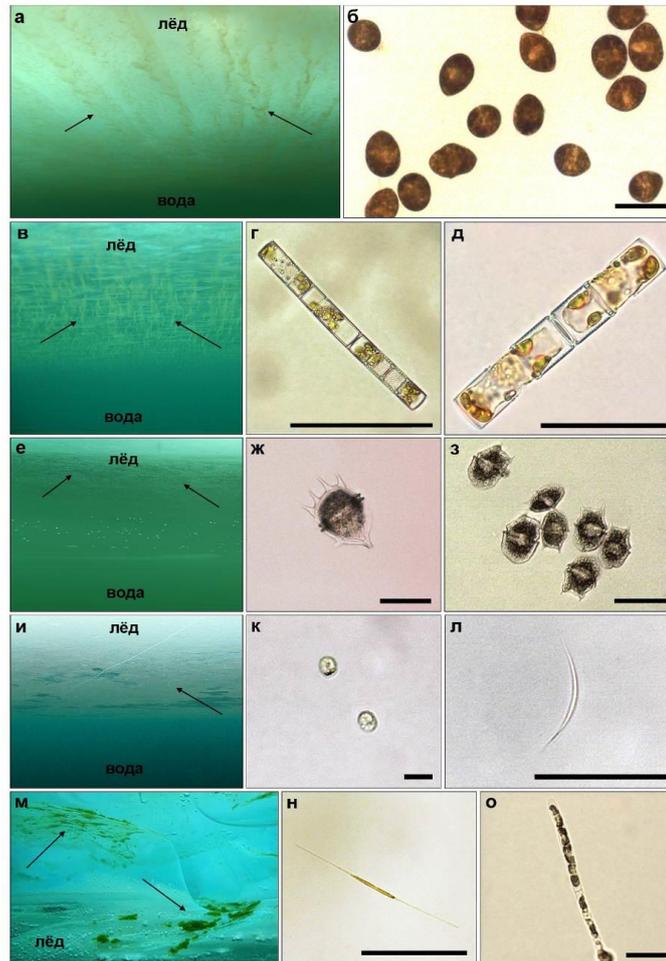


Рис. 3. Подледные сообщества оз. Байкал. Сообщества вблизи пос. Большие Коты: динофлагеллят *G. baicalense* (а, б); диатомей *A. baicalensis* (в, г), *A. islandica* (в, д); динофлагеллят *P. baicalense* (е, ж) и *P. euryseps* (е, з); зелёных водорослей *Chlorella vulgaris* (и, к) и *Monoraphidium griffithii* (и, л). Сообщество Малого Моря («выход») (м), *S. acus* (н), зелёные водоросли (о). А, в, е, и, м – подледная фотосъемка (И.В. Ханаев), стрелками указаны сообщества на нижней поверхности льда; остальные микрофотографии – световая микроскопия. Масштаб: а, н – 100 мкм; б, д, ж, з, л, о – 50 мкм; к – 10 мкм

В экстремальных подледных условиях численность культивируемых бактерий, обитающих на границе лед-вода, варьировала в широких пределах: от 2 до 5148 КОЕ/мл (колониеобразующая единица на мл), выросших на среде ДА при 4 °С, и от 2 до 12584 КОЕ/мл – при 25 °С; на среде РПА:10 численность культивируемых при 4 °С бактерий варьировала в пределах 1–16876 КОЕ/мл, при 25 °С – 2–20176 КОЕ/мл.

Полученные колонии были разнообразны по форме и имели различную окраску: жёлтую, оранжевую, белую, розовую и фиолетовую, однако на среде ДА преобладали белые мелкие колонии, чем на среде РПА:10. Пигмент, присутствующий в клетках бактерий, защищает их от ультрафиолетового излучения, которое способствует повреждению ДНК (Garrity et al., 2005). Байкальский лёд очень прозрачный и весной через него в воду проникает 20–28 % солнечного света (Sherstyankin, 1975), при небольшой толщине снежного покрова (< 5 см) верхний подледный слой достаточно освещен (Granin et al., 2001). В период исследования в районе пос. Большие Коты заснеженность озера варьировала от 50 до 100 %, а на Малом Море заснеженность была минимальной 1–10 %. Толщина снежного покрова была небольшой от 0,5 до 5 см, что не препятствует поступлению света под лед. С этим скорее всего связана пигментация бактериальных колоний.

Из подледных сообществ озера Байкал получена коллекция 150 чистых культур. Морфологически подледные бактерии различались, доля различных морфотипов от общего количества культур составляла: палочки – 69 %, кокки – 21 %, клетки овоидной формы – 5 % и дрожжеподобные клетки – 5 %.

Как показал анализ, подледные бактерии ферментативно активны, из 45 исследованных чистых культур в 32 выявлена какая-либо из ферментативных активностей, причем, в основном – множественная (рис. 4). Из 32 этих культур 24 были отобраны из сообществ с доминированием динофлагеллят (ЛЗ и СЗ, март 2011 г.), 4 культуры – из сообщества с доминированием диатомей *A. baicalensis* и *A. islandica* (ГЗ, март 2011 г.), 2 культуры – из сообщества диатомей *S. acus* и зелёных водорослей (ММ «выход») и 2 культуры – из сообщества с доминирование зелёных водорослей *Chlorella* и *Monoraphidium*. Из 7 культур, обладающих всеми исследованными активностями, 4 были изолированы из альго-бактериальных сообществ диатомовых водорослей.

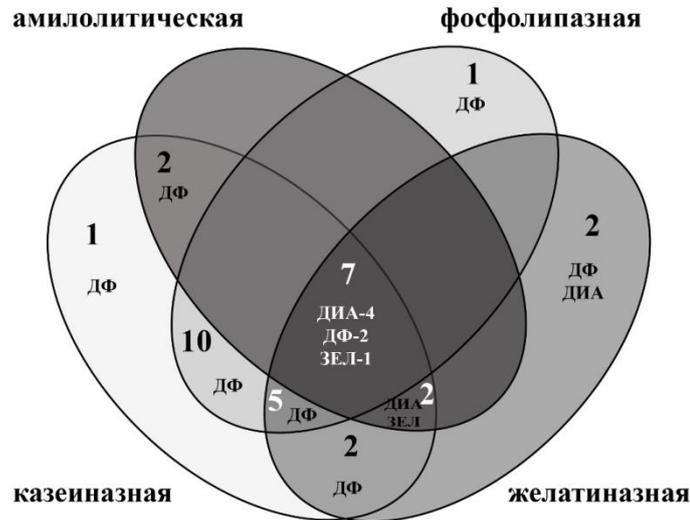


Рис. 4. Диаграмма Венна по распределению различных ферментативных активностей среди изолятов бактерий из подледных сообществ оз. Байкал: числа – количество изолятов с определенными активностями; буквами отмечены сообщества, из которых они были выделены: ДФ – динофлагеллят; ДИА – диатомей и ЗЕЛ – зелёных водорослей

Для определения таксономической принадлежности методом секвенирования гена 16S рРНК были отобраны 10 культур бактерий с разными морфологическими признаками (рис. 5), ферментативной активностью и выделенные при разных условиях культивирования из сообществ с разными доминирующими видами микроводорослей (табл. 2).

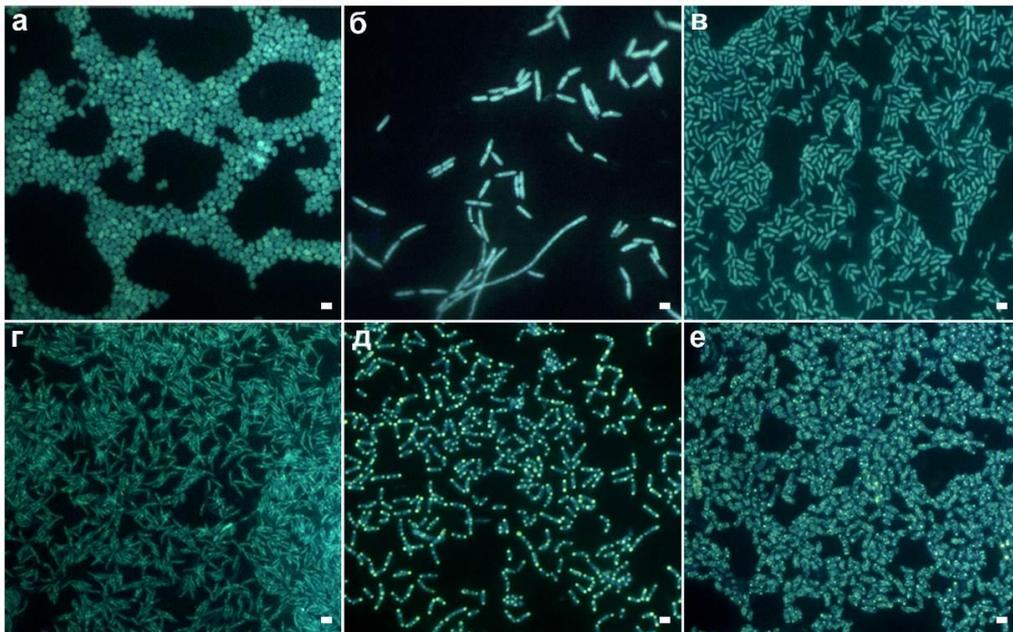


Рис. 5. Морфология изолятов бактерий, выделенных из подледных сообществ, отобранных для секвенирование гена 16S рРНК: овоидные клетки (UI28) (а), палочки, образующие нитевидные колонии (UI41) (б), палочки (UI11) (в), тонкие палочки (UI38) (г), палочки (UI7) (д) и овоидные клетки (UI9) (е); эпифлуоресцентная микроскопия, окраска ДАФИ. Масштаб: 1 мкм

Таблица 2. Характеристика изолятов бактерий из подледных сообществ оз. Байкал, отобранных для секвенирования

ID	Место отбора	Дата	Доминирующий вид водорослей	Условия культивирования	Окраска колонии	Форма клеток	Ферментативная активность			
							протеолитическая казеиназа	желатиназа	фосфолипаза	амилаза
UI 28	БК_ГЗ	03.03.11	<i>A. baicalensis</i> , <i>A. islandica</i>	ДА, 4 °С	белая	овоидная	+	+	+	+
UI 41	БК_ГЗ	03.03.11		ДА, 25 °С	жёлтая	палочки, нитевид. колонии	-	+	-	-
UI 52	БК_ГЗ	03.03.11		РПА:10, 4 °С	белая	палочки	+	+	+	+
UI 53	БК_ГЗ	03.03.11		РПА:10, 4 °С	белая	палочки	+	+	+	+
UI 5	БК_ЛЗ	25.03.15		РПА:10, 25 °С	розовая	овоидная	-	-	-	-
UI 11	БК_СЗ	25.03.15	<i>Chlorella</i> , <i>Monoraphidium</i>	РПА:10, 4 °С	оранжевая	палочки	+	+	+	-
UI 38	БК_ГЗ	25.03.15	<i>S. acus</i> и зелёные водоросли	ДА, 4 °С	жёлтая	тонкие палочки	+	+	+	+
UI 7	ММ выход	19.03.16		РПА:10, 4 °С	оранжевая	палочки	+	+	+	-
UI 9	ММ выход	19.03.16		РПА:10, 4 °С	розовая	овоидная	-	-	-	-
UI 10	ММ выход	19.03.16		РПА:10, 4 °С	белая	палочки	+	+	+	+

Согласно результатам филогенетического анализа гена 16S рРНК (рис. 6), три культуры (UI28, UI52 и UI53) имеют гомологию с последовательностями *Pseudomonas putida* и *P. psychrophila* из базы данных GenBank. Данные культуры изолированы из сообщества с доминированием диатомей *Aulacoseira baicalensis* и *A. islandica*. С помощью эпифлуоресцентной микроскопии этого сообщества показано, что бактерии ассоциируются с клетками микроводорослей (рис. 7). Выделенные культуры бактерий обладают всеми исследуемыми нами ферментативными активностями, что способствует получению питательных веществ за счет деструкции органических компонентов диатомей. Взаимосвязь представителей рода *Pseudomonas* с диатомовыми водорослями показана и ранее, как в природных условиях, на примере ассоциации этих бактерий с клетками *A. islandica* в подледный период и на озере Эри (D'souza et al., 2013), так и в лабораторных условиях при культивировании с морской диатомеей *Asterionella glacialis* (Riquelm et al., 1988). Нами ранее также было показано, что в подледных сообществах озера Байкал бактерии могут находиться в ассоциации с клетками диатомей (Bashenkhaeva et al., 2015).

Кроме того, в результате проведенного нами исследования были получены последовательности с гомологией 99-100 % с *Methylobacterium extorquens*, *Rhodococcus aerolatus*, *Brevundimonas aurantiaca*, *B. vesicularis*, *Sphingomonas subarctica*, *Roseomonas frigidaqua* и *Janthinobacterium lividum*, способными к выживанию при низких температурах (Nohynek et al., 1996; Miteva et al., 2004; Christner et al., 2008; Kim et al., 2009; Schloss et al., 2010).

Представители данных родов были также детектированы в подледных микробных сообществах оз. Байкал методом высокопроизводительного секвенирования участка гена 16S рРНК (Bashenkhaeva et al., 2015), где было показано, что наибольшая доля последовательностей относится к филумам *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Большинство из определенных нами в данной работе чистых культур бактерий также относятся к филуму *Proteobacteria*. Безусловно, применение высокопроизводительного секвенирования позволяет получить наиболее полную информацию о таксономической структуре сообщества, учитывая и некультивируемые бактерии. Однако с чистыми культурами бактерий открываются возможности получения информации об их физиологических свойствах, таких как ферментативная активность, и также для изучения механизмов адаптации этих организмов к условиям среды обитания.

Таким образом, из подледных альго-бактериальных сообществ озера Байкал выделено 150 чистых культур психрофильных бактерий. Множественная ферментативная активность, показанная для изолятов, может способствовать выживанию этих организмов при ограничении или смене доступного питательного вещества. Ферментативно активные бактерии в ассоциации с диатомовыми водорослями могут разрушать органические компоненты микроводорослей, в том числе – покрывающие кремнеземные панцири диатомей, и, тем самым, участвовать в круговороте общего органического вещества и Si. Культуры байкальских психрофильных бактерий филогенетически сходны с психрофилами из других локализаций и могут служить объектами для исследования механизмов адаптации к экстремальным условиям окружающей среды, а также в качестве источника новых ферментов, работающих при низких температурах.

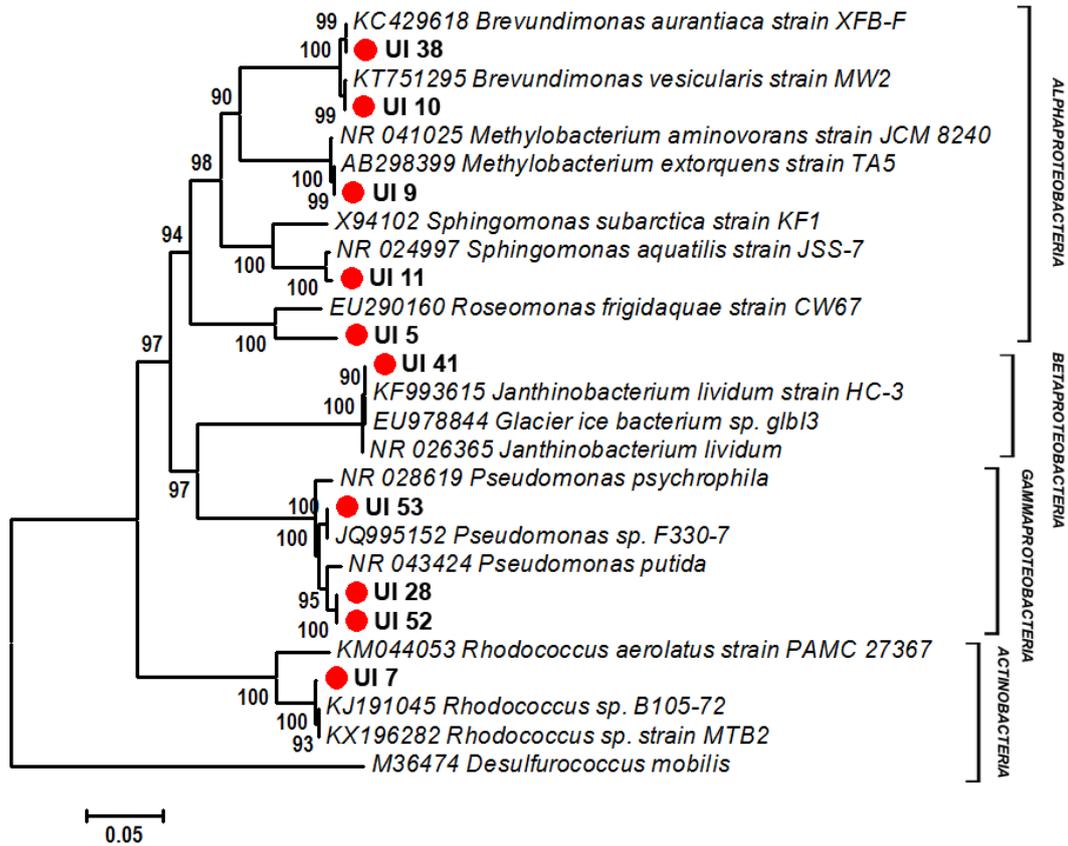


Рис. 6. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактерий из подледных сообществ оз. Байкал.

Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью "bootstrap"-анализа 1000 альтернативных деревьев; красными кружками отмечены культуры из озера Байкал

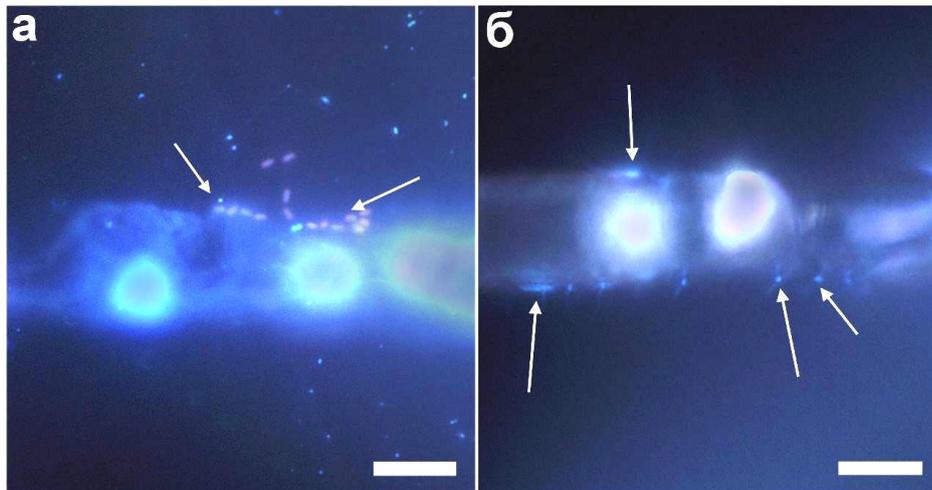


Рис. 7. Ассоциации бактерий с диатомовыми водорослями рода *Aulacoseira* (БК_ГЗ, 03.03.2011) (а, б); эпифлуоресцентная микроскопия, окраска ДАФИ. Масштаб – 10 мкм.

Благодарности

Авторы выражают благодарность д.б.н., проф. Е.В. Лихошвай за помощь в обсуждении результатов; И.В. Ханаеву и к.б.н. А.Б. Купчинскому за отбор проб и консультации; к.б.н. М.В. Усольцевой и Л.А. Титовой за помощь в определении видов микроводорослей; к.б.н. Петровой за помощь в подготовке проб к секвенированию. Микробиологические исследования выполнены в рамках темы ФАНО № 0345–2014–0001 «Исследования эволюционных, экологических и молекулярно-биологических аспектов кремний-зависимых хромист как основных участников круговорота кремния в водных экосистемах», секвенирование гена 16S рРНК выполнено в рамках темы гос. задания ФАНО № 0345–2016–0005 «Экспериментальные исследования геномов и протеомов биоты пресноводных экосистем», микроскопические исследования проведены в ЦКП "Электронная микроскопия", входящем в ОЦКП "Ультрамикрoанализ" ЛИН СО РАН.

References

- Azam, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10, 257–263.
- Azam, F., Malfatti, F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10), 782–791.
- Bashenkhaeva, M.V., Zakharova, Yu.R., Galachyants, Yu.P., Petrova, D.P., Khanaev, I.V., Likhoshway, Ye.V. (2015). Sub-ice microalgal and bacterial communities in freshwater Lake Baikal, Russia. *Microb. Ecol.*, 70(3), 751–765.
- Bashenkhaeva, M.V., Zakharova, Yu.R., Galachyants, Yu.P., Khanaev, I.V., Likhoshway, Ye.V. (2017). Bacterial communities during the period of massive under-ice dinoflagellate development in Lake Baikal. *Microbiology*, 86(4), 524–532. doi: 10.1134/S0026261717040038.
- Bondarenko, N.A., Timoshkin, O.A., Röpstorf, P., Melnik, N.G. (2006). The under-ice and bottom periods in the life of *Aulacoseira baicalensis* (K. Meyer) Simonsen, a principal Lake Baikal alga. *Hydrobiologia*, 568, 107–109. doi: 10.1007/s10750-006-0325-7.
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K.S., Andrews, D., & Sowers, K.R. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 253–261.
- Christner, B.C., Skidmore, M.L., Priscu, J.C., Tranter, M., & Foreman, C.M. (2008). Bacteria in subglacial environments. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*, 51–71.
- Coleman, A.W. (1980). Enhanced detection of bacteria in natural environments by fluorochrome staining of DNA. *Limnology and Oceanography*, 25(5), 948–951.
- Cota, G.F. (1991). Ecology of bottom ice algae: II. Dynamics, distributions and productivity. *J. Marine Syst.*, 2, 279–295.
- De Maayer, P., Anderson, D., Cary, C., & Cowan, D.A. (2014). Some like it cold: understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports*, e201338170.
- D'souza, N.A., Kawarasaki, Y., Gantz, J.D., Lee, R.E., Beall, B.F.N., Shtarkman, Y.M., & McKay, R.M.L. (2013). Diatom assemblages promote ice formation in large lakes. *The ISME Journal*, 7(8), 1632–1640.
- Feller, G., Narinx, E., Arpigny, J.L., Aittaleb, M., Baise, E., Genicot, S., & Gerday, C. (1996). Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(2-3), 189–202.
- Galazy, G.I. (1993). Atlas ozera Bajkal. Moscow, Ruscartography (in Russian).
- Garrity, G.M., Bell, J.A., & Lilburn, T. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. US: Springer.
- Gilbert, J.A., Hill, P.J., Dodd, C.E., & Laybourn-Parry, J. (2004). Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, 150(1), 171–180.
- Gorbenko, A.Yu., Dzuban, A.N., Krylova, I.N. (1992). Absolyutnyj kolichestvennyj uchet bakterij v donnyh otlozheniyah. *Mikrobiologiya*, 61(6), 1082–1086 (in Russian).
- Granin, N.G., Jewson, D.H., Gnatovsky, R.Y., Levin, L.A., Zhdanov, A.A., Gorbunova, L.A., ... & Mogilev, N.Y. (2001). Turbulent mixing under ice and the growth of diatoms in Lake Baikal. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, 27(5), 2812–2814.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41), 95–98.
- Hébraud, M., Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J. Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 211–219.
- Jewson, D.H., Granin, N.G., Zhdanov, A.A., Gorbunova, L.A., Bondarenko, N.A., & Gnatovsky, R.Y. (2008). Resting stages and ecology of the planktonic diatom *Aulacoseira skvortzowii* in Lake Baikal. *Limnology and Oceanography*, 53(3), 1125–1136.
- Jewson, D.H., Granin, N.G., Zhdanov, A.A., & Gnatovsky, R.Y. (2009). Effect of snow depth on under-ice irradiance and growth of *Aulacoseira baicalensis* in Lake Baikal. *Aquatic ecology*, 43(3), 673–679.
- Jewson, D.H., & Granin, N.G. (2015). Cyclical size change and population dynamics of a planktonic diatom, *Aulacoseira baicalensis*, in Lake Baikal. *European journal of phycology*, 50(1), 1–19.
- Kim, M.S., Baik, K.S., Park, S.C., Rhee, M.S., Oh, H.M., & Seong, C.N. (2009). *Roseomonas frigidaquae* sp. nov., isolated from a water-cooling system. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(7), 1630–1634.
- Marmur, J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Molecular Biology*, 3(2), 208–218.
- Miteva, V.I., Sheridan, P.P., & Brenchley, J.E. (2004). Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 202–213.
- Netrusov, A.I., Egorova, M.A., Zakharchuk L.M. et al. (2005). Praktikum po mikrobiologii: Uchebnoe posobie dlya studentov vysshih uchebnyh zavedenij. Moscow, Izdatel'skij centr «Akademiya» (in Russian).
- Nohynek, L.J., Nurmiaho-Lassila, E.L., Suhonen, E.L., Busse, H.J., Mohammadi, M., Hantula, J., ... & Salkinoja-Salonen, M.S. (1996). Description of Chlorophenol-Degrading *Pseudomonas* sp. Strains KF1T, KF3, and NK1 as a New Species of the Genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 1042–1055.
- Obolkina, L.A., Bondarenko, N.A., Doroschenko, L.F., Gorbunova, L.A., Molozhavaya, O.A. (2000). O nahodke kriofil'nogo soobshchestva v ozere Bajkal. *Doklady Akademii Nauk*, 371, 815–817 (in Russian).
- Pomazkina, G.V., Belykh, O.I., Domysheva, V.M., Sakirko, M.V., Gnatovsky, R.Y. (2010). Structure and dynamics of phytoplankton of Southern Baikal (Russia). *Intern. J. Algae* 12(1), 64–79. doi:10.1615/InterJAlgae.v12.i1.50.

Popovskaya, G.I. (1977). Dinamika fitoplanktona pelagiali Bajkala (1964–1974). *Biologicheskaya produktivnost' pelagiali Bajkala i ee izmenchivost'*. Novosibirsk, Nauka (in Russian).

Riquelm, C.E., Fukami, K., & Ishida, Y. (1988). Effects of bacteria on the growth of a marine diatom, *Asterionella glacialis*. *Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology*, 3(1), 29–34.

Straškrábová, V., Izmešt'eva, L.R., Maksimova, E.A., Fietz, S., Nedoma, J., Borovec, J., Kobanova, G.I., Shchetinina, E.V., Pislegina, E.V. (2005). Primary production and microbial activity in the euphotic zone of Lake Baikal (Southern Basin) during late winter. *Glob Planet Chang.*, 46, 57–73. doi:10.1016/j.gloplacha.2004.11.006.

Sherstyankin P.P. (1975) *Ehkspereimentalnye issledovaniya podlednogo svetovogo polya ozera Bajkal*. Novosibirsk, Nauka (in Russian).

Schloss, P.D., Allen, H.K., Klimowicz, A.K., Mlot, C., Gross, J.A., Savengsuksa, S., ... & Handelsman, J. (2010). Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA and cell biology*, 29(9), 533–541.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.

Votintsev, K.K., Meshcheryakova, A.I., Popovskaya, G.I. (1975). *Krugovorot organicheskogo veshchestva v ozere Bajkal*. Novosibirsk, Nauka (in Russian).

Zakharova, Y.R., Adel'shin, R.V., Parfenova, V.V., Bedoshvili, Y.D., Likhoshway, Y.V. (2010). Taxonomic characterization of microorganisms associated with cultured diatoms *Synedra acus* from Lake Baikal. *Microbiology*, 79(5), 679–687. doi:10.1134/S0026261710050139.

Citation:

Bashenkhaeva, M.V., Zakharova, Yu.R. (2017). Cultivated bacteria from the sub-ice algae-bacterial communities of Lake Baikal. *Acta Biologica Sibirica*, 3 (3), 76–85.

Submitted: 07.06.2016. **Accepted:** 05.08.2017

crossref <http://dx.doi.org/10.14258/abs.v3i3.3619>



© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).