

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАКТЕРИЙ ЦИКЛА СЕРЫ В ДОННЫХ ОСАДКАХ ХЕРСОНЕССКОЙ БУХТЫ

© 2018 г. А. Л. Брюханов^{1,2,*}, М. А. Власова², Т. В. Малахова³, А. А. Перевалова²,
Н. В. Пименов²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

³Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

*E-mail: brjuchanov@mail.ru

Поступила в редакцию 19.09.2017 г.

Черное море — крупнейший меромиктический водоем, в донных осадках которого протекает мощный биогенный процесс образования сероводорода. Целью настоящей работы стало получение данных о филогенетическом разнообразии микроорганизмов цикла серы (сульфатредуцирующих и сероокисляющих бактерий), обитающих в черноморских прибрежных газонасыщенных донных отложениях. Образцы отбирали в Херсонесской (Голубой) бухте в акватории г. Севастополя из белёсых бактериальных обрастаний сульфуретт, а также из верхнего слоя близлежащего грунта. С препаратами ДНК, выделенными из нативных проб и полученных накопительных культур, был проведен ПЦР-анализ с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участкам гена 16S рРНК основных подгрупп сульфатредуцирующих бактерий (СРБ), а также к участкам гена *dsrB* (восстановительного и окислительного типов), который кодирует β-субъединицу диссимиляционной (би)сульфитредуктазы — ключевого фермента цикла серы, присущего сульфатредуцирующим и сероокисляющим микроорганизмам. В пробах ДНК, выделенных из прибрежных донных микробных обрастаний, показано наличие участков гена 16S рРНК, которые характерны для представителей родов *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*—*Desulfonema*—*Desulfosarcina* и *Desulfovibrio*—*Desulfomicrobium*. Методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) с последующим секвенированием реамплифицированных участков гена *dsrB* было показано, что по аминокислотным последовательностям, кодируемым геном *dsrB* восстановительного типа, СРБ из прибрежных газонасыщенных донных осадков Черного моря имели наибольшую гомологию (92–99%) с геном *dsrB* культивируемых СРБ родов *Desulfovibrio*, *Desulfatitalea*, *Desulfobacter*, *Desulfobacterium*. Выявлена также высокая гомология с некультивируемыми штаммами СРБ из различных морских местообитаний, в частности, из донных осадков Северного и Японского морей. Аминокислотные последовательности, кодируемые геном *dsrB* окислительного типа, обладали наибольшей гомологией (90–99%) к соответствующему гену представителей сероокисляющих бактерий родов *Thiocapsa*, *Thiobaca*, *Thioflavococcus* и *Thiorhodococcus*.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии, сероокисляющие (тионовые) бактерии, Черное море, донные осадки, микробные маты, сообщества микроорганизмов, диссимиляционная (би)сульфитредуктаза, ген *dsrB*.

DOI: 10.7868/S0026365618030060

Черное море — самый крупный в мире меромиктический анаэробный водоем, в донных осадках которого протекает активный процесс биогенного образования сероводорода. Известно, что микроорганизмы цикла серы играют важнейшую роль в биогеохимических процессах, происходящих в донных осадках Мирового океана. Изучение сульфатредукции, а также сопряженного с ней окисления серы и вовлеченных в эти процессы микроорганизмов, несомненно, является одним из ключевых векторов исследования биогеохимии и таксономической структуры морских экосистем в целом и Чёрного моря, в частности.

Радиоизотопными, микроскопическими и молекулярно-биологическими методами в нескольких работах была показана высокая метаболическая активность и присутствие сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в водной толще на различных глубинах (Vetriani et al., 2003; Neretin et al., 2007; Брюханов и соавт., 2011), а также в глубоководных осадках (Leloup et al., 2009; Blazejak, Schippers, 2011; Schippers et al., 2012) и микробных матах карбонатных построек в районах холодных метановых сипов континентального склона Черного моря (Пименов, Иванова, 2005; Wrede et al., 2008; Kleindienst

et al., 2012). Определение скоростей микробиологических процессов цикла метана (метаноокисления и метанобразования), а также процесса сульфатредукции, который в восстановленных зонах донных осадков и микробных матов сопряжен с анаэробным окислением метана, позволяет количественно оценить масштабы вовлечения метана черноморских сипов в глобальный биогеохимический круговорот. Что касается сероокисляющих (тионовых) бактерий Чёрного моря, то на основе секвенирования гена 16S рРНК показано наличие филаментных серных бактерий родственных *Beggiatoa* в микробных матах в районе обрыва шельфа (глубина 150–170 м) северо-западной части Черного моря у побережья Крымского полуострова, причем под этими матами наблюдалось аккумулятивное органического вещества и интенсивная сульфатредукция (Jessen et al., 2016).

Однако к настоящему времени еще не было проведено молекулярно-экологических исследований филогенетического разнообразия и идентификации сульфатредуцирующих (СРБ) и сероокисляющих бактерий на мелководных площадках струйных газовыделений шельфа и в газонасыщенных осадочных отложениях прибрежной зоны Черного моря, которые остаются в этом смысле практически неисследованными.

Известно, что в верхних горизонтах анаэробных морских осадочных отложений терминальная фаза минерализации органических веществ в присутствии сульфатов происходит при участии строго анаэробных СРБ, которые используют доступные им преимущественно низкомолекулярные органические вещества или молекулярный водород, восстанавливая сульфаты до сероводорода. В период наиболее высоких скоростей сульфатредукции H_2S может проникать в водную толщу и вызывать массовую гибель придонной фауны. Однако в анаэробных осадочных отложениях прибрежных высокопродуктивных морских районов за счет высокой скорости сульфатредукции происходит существенное уменьшение концентрации сульфатов в поровых водах, и более 50% осажденного органического вещества в терминальной фазе разлагается при участии метаногенных архей (Jørgensen et al., 1990). Часть образуемого метана окисляется аэробными метанотрофами, живущими в поверхностном окисленном слое донных осадков и в водной толще (Ivanov et al., 2002), а в бескислородной зоне морских осадочных отложений вблизи зоны перехода от сульфатных к метановым илам процесс анаэробного окисления метана осуществляется консорциумами сульфатредуцирующих бактерий и метаногенных архей (Hoehler et al., 1994; Voetius et al., 2000). Тем не менее, значительная часть метана, образуемого в мелководных морских донных осадках, в виде газовых высачиваний выходит в атмосферу

(Novland et al., 1993; Judd, 2004). Вдоль северного и западного (крымского, кавказского, болгарского) побережий Черного моря такие струйные газовыделения метана (преимущественно биогенного происхождения) широко распространены и оказывают заметное влияние на биогеохимические процессы в черноморском регионе (Ткешелашвили и соавт., 1997; Amouroux et al., 2002; Dimitrov et al., 2002; Michaelis et al., 2002; Егоров и соавт., 2012). Однако в мелководных сипах у Южного берега Крыма не исключается также и разгрузка термогенного метана (Лысенко, Шик, 2013).

Исследования мелководных сипов в бухтах г. Севастополя дали первые количественные оценки интенсивностей микробных процессов образования и окисления метана, а также сульфатредукции, в донных осадочных отложениях, обогащенных в верхних слоях органическим веществом (Пименов и соавт., 2013). На обнаруженных площадках прибрежных струйных газовыделений в Херсонесской бухте Гераклеяского полуострова (г. Севастополь) было показано, что в составе пузырькового газа, разгружающегося из подстилающих геологических структур в этой бухте, преобладает метан биогенного происхождения (изотопный состав $\delta^{13}C-CH_4$ характеризовался величиной – 60.4‰, содержание метана – до 70%). Максимум скорости сульфатредукции в этих донных осадках находился в подповерхностном горизонте (2–4 см), а глубже, у зоны перехода от сульфатных к метановым илам, наблюдалась активность процесса анаэробного метаноокисления, сопряженного с сульфатредукцией. В районах выхода газов были обнаружены белёсые бактериальные пленки микробных сообществ типа “*Thiodendron*”, в которых под микроскопом были видны спирохетообразные нитчатые формы клеток (Малахова и соавт., 2015).

В связи с тем, что сульфатредуцирующие бактерии являются филогенетически неоднородной группой микроорганизмов, для их обнаружения в экосистемах в качестве основного филогенетического маркера чаще всего используют ген *dsrB* (Geets et al., 2006; Bagwell et al., 2009), кодирующий β -субъединицу диссимиляционной (би)сульфитредуктазы (КФ 1.8.99.1) – ключевого фермента реакции восстановления сульфита в сульфид, присущего всем сульфат- и сульфитредуцирующим микроорганизмам. Многие (в особенности, накапливающие серу в клетках) сероокисляющие прокариоты, являющиеся центральным компонентом в глобальном биогеохимическом цикле серы, также обладают диссимиляционной (би)сульфитредуктазой, но катализирующей обратную реакцию – в этом случае для филогенетического анализа, практически совпадающего с дендрограммами на основе гена 16S рРНК, используют ген *dsrB*

окислительного типа (Loy et al., 2009; Müller et al., 2015).

Целью настоящей работы было получение данных о филогенетическом разнообразии сообщества бактерий биогеохимического цикла серы (сульфатредуцирующих и сероокисляющих), обитающих в газонасыщенных прибрежных донных осадках Черного моря в районе Крымского полуострова (акватория г. Севастополя), посредством ПЦР-анализа и денатурирующего градиентного гель-электрофореза с последующим секвенированием фрагментов ключевого функционального гена *dsrB*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор донных образцов. Образцы отбирали в августе 2015 г. с борта катера, оснащенного гидрологическим CTD-зондом SD204 ("SAIV A/S", Норвегия), в Херсонесской (Голубой) бухте Черного моря в акватории г. Севастополя (станция с координатами 44.5647° N, 33.3993° E) с глубины 5 м из поверхностных белёсых бактериальных обрастаний сульфуретт в районе метановых газовыделений, а также из верхнего слоя (0–5 см), близлежащего к струйным газовыделениям и микробным матам донного грунта, в качестве фонового образца. Гранулометрический состав грунтов определяли по массовому содержанию частиц различной крупности, выраженному в процентах, по отношению к массе сухой пробы осадков (анализ производили ситовым методом сухого рассеивания с набором сит 5.0; 2.0; 1.2; 0.9; 0.2 и 0.09 мм). Отобранные в стерильные пластиковые контейнеры с завинчивающимися крышками образцы донных осадков заливали до верха в соотношении 2 : 1 буферным раствором (состава 50 мМ Трис-НСl, pH 8.0; 150 мМ NaCl и 100 мМ Na₂-ЭДТА) и хранили при 4°C. Эти образцы использовали в дальнейшем для молекулярного филогенетического анализа нативного микробного сообщества, а также для получения накопительных культур сульфатредуцирующих и сероокисляющих (тионовых) бактерий.

Получение накопительных культур сульфатредуцирующих и сероокисляющих бактерий. Для получения накопительных культур в качестве посевного материала использовали сильновосстановленные осадки со слоем микробных обрастаний, обогащенные свободным сероводородом, а также близлежащий донный грунт. Накопительные культуры СРБ на жидкой питательной среде Постгейта С для морских СРБ (DSMZ 163 – номер из каталога питательных сред немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур <https://www.dsmz.de>) получали методом предельных разведений до 10⁻⁹ (культивирование осуществляли в анаэробных условиях при 4 и 22°C), затем посевы

проводили в столбики агаризованной питательной среды и пересеивали полученные отдельные колонии снова в жидкую питательную среду Постгейта С с использованием различных доноров электронов. Развитие культур оценивали по росту биомассы и образованию H₂S, определяемого колориметрическим методом с использованием N,N-диметилпарафенилендиамина (Trüper, Schlegel, 1964). Накопительные культуры сероокисляющих (тионовых) бактерий получали аналогичным образом на жидкой питательной среде Пфеннига I для пурпурных серных бактерий (DSMZ 28) и питательной среде Пфеннига II для зеленых серных бактерий (DSMZ 29). Микроскопирование осуществляли при увеличении ×1000 на микроскопе Axio Imager. D1 ("Carl Zeiss", Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC.

Амплификация участков генов 16S рРНК и *dsrB*. Выделение тотальной ДНК из нативных бактериальных обрастаний, донного грунта и накопительных культур осуществляли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit ("Thermo Fisher Scientific", США) согласно протоколу производителя. Выделенную ДНК дополнительно переосаждали в течение 20 мин при –20°C 3 М ацетатом натрия (0.1 объема) и 96%-ным этанолом (3 объема) для освобождения от низкомолекулярных соединений.

С тотальной ДНК проводили ПЦР-анализ с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к участкам гена *dsrB* (восстановительного и окислительного типов), кодирующего β-субъединицу диссимиляционной (би)сульфитредуктазы. Для детекции наличия в образцах участков гена 16S рРНК, характерных для основных филогенетических подгрупп СРБ, применяли более чувствительный метод "вложенной" ПЦР, при котором в качестве матрицы использовали не нативную выделенную из образцов ДНК, а продукты амплификации участков гена 16S рРНК *Bacteria*. Список использованных в исследовании ПЦР-праймеров, синтезированных в компании "Синтол" (Россия), приведен в таблице.

Реакционные смеси для ПЦР содержали ~1–3 нг/мкл ДНК-матрицы; 2.0 мМ MgCl₂; 400 мкМ дНТФ ("Thermo Fisher Scientific", США); по 500 нМ каждого праймера и 0.1 ед/мкл *Taq* ДНК-полимеразы ("Thermo Fisher Scientific", США). В качестве положительного контроля на сульфатредуцирующие и сероокисляющие бактерии использовали в качестве матрицы ДНК, выделенную из *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough и *Allochromatium vinosum*, соответственно. ПЦР проводили с использованием амплификатора GeneAmp PCR System 9700 ("Thermo Fisher Scientific", США) при следующем режиме: 10 мин при 95°C; 35 циклов – 30 с при 95°C, 40 с при

температуре отжига (T_a) соответствующей пары праймеров, 3 мин при 72°C; 10 мин при 72°C. Все ПЦР ставили в трех повторностях для получения достоверных результатов.

Продукты амплификации выявляли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле в 1×TAE буферном растворе (pH 8.0) с последующей окраской геля бромистым этидием (0.5 мкг/мл) и визуализацией полос под проходящим УФ-светом (λ 254 нм) на трансиллюминаторе ECX-15.C (“Vilber Lourmat”, Франция). В качестве маркеров для определения размера и концентрации амплифицированных участков ДНК использовали ДНК-маркеры MassRuler (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Продукты амплификации очищали с помощью наборов для концентрирования ДНК и выделения ДНК из агарозного геля – DNA Gel Extraction Kit (“Thermo Fisher Scientific”, США) и innuPREP DOUBLEpure Kit/innuPREP Gel Extraction Kit (“Analytic Jena”, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Денатурирующий градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ). Продукты амплификации участков гена *dsrB* разделяли по степени прочности вторичной структуры посредством денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ), являющегося широко распространенным методом анализа ампликонов с целью выяснения структуры микробных сообществ. Для улучшения разделения фрагментов ДНК в ходе проведения ДГГЭ в последовательности прямых ПЦР-праймеров DSRp2060F и *dsrB* F1a (таблица), специфичных к гену *dsrB* (восстановительного и окислительного типа соответственно), с 5'-конца был введен GC-богатый участок длиной 40 п.о. (Muyzer et al., 1993); ПЦР проводили в этом случае с увеличенным до 1 мин временем денатурации и отжига. Продукты ПЦР-амплификации наносили непосредственно в 8%-ный (по объему) полиакриламидный гель с градиентом концентрации акриламида 35–65% в 0.5×TAE буферном растворе (20 мМ Трис-ацетат, pH 7.4; 10 мМ ацетат натрия; 0.5 мМ Na₂-ЭДТА). Для приготовления 8%-ного полиакриламидного геля использовали коммерческий раствор акриламида/N,N-метилен-бис-акриламида (37.5:1) производства “Bio-Rad Laboratories” (США); градиенты концентрации 35–65% были сформированы 8%-ными (по объему) растворами акриламида/N,N-метилен-бис-акриламида, которые содержали 0 и 100% денатурирующего агента соответственно. В качестве денатурирующих агентов для приготовления 100%-ного раствора одновременно использовали 7 М мочевины (“Bio-Rad Laboratories”, США) и 40%-ный деионизированный формамид (“Merck”, Германия). Персульфат аммония добавляли в качестве инициатора

процесса полимеризации, а TEMED – в качестве катализатора этого процесса. В данной работе использовали прибор для проведения денатурирующего градиентного гель-электрофореза производства “Scie-Plas” (Великобритания).

Электрофорез проводили при постоянном напряжении 70 В и температуре 60°C в течение 16–17 ч. После электрофореза гель промывали дистиллированной водой и затем окрашивали SYBR® Gold (“Thermo Fisher Scientific”, США) в течение 40 мин в темноте. После окрашивания гель визуализировали на трансиллюминаторе, получившиеся отдельные полосы вырезали, помещали их в пробирки с 20 мкл стерильной дистиллированной воды и оставляли при 4°C на 16 ч для элюирования фрагментов ДНК из геля.

Секвенирование участков гена *dsrB*, филогенетический анализ. Используя элюированные из ДГГЭ-полос фрагменты ДНК в качестве матрицы, осуществляли препаративную ПЦР (с использованием пар праймеров DSRp2060F/DSR4R на ген *dsrB* восстановительного типа и *dsrB* F1a/4RSI2a на ген *dsrB* окислительного типа) для реамплификации соответствующих участков ДНК и очищали полученные фрагменты из 1%-ного агарозного геля с помощью набора Cleanup Mini для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (“Евроген”, Россия). Нуклеотидные последовательности участков гена *dsrB* (концентрация ДНК в полученных препаратах – 52–93 нг/мкл) определяли по методу Сэнгера с помощью набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit и праймера DSRp2060F или *dsrB* F1a на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3730 (“Thermo Fisher Scientific”, США) в Институте биоинженерии ФИЦ Биотехнологии РАН.

Анализ сходства соответствующих аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB* восстановительного и окислительного типов, с известными последовательностями из базы данных GenBank проводили после выравнивания в программе ClustalW с помощью программных пакетов BioEdit и BLAST. Филогенетические дендрогаммы строили по методу максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), реализованному в программе MEGA 7.0.21 (Kumar et al., 2016), используя близкие по гомологии референтные последовательности из GenBank. Полученные в исследовании нуклеотидные последовательности участков гена *dsrB* депонированы в GenBank под номерами KY983391–KY983397 (*dsrB* восстановительного типа) и MF041801–MF041804 (*dsrB* окислительного типа).

Таблица. Используемые в исследовании праймеры и ПЦР-анализ филогенетического состава сообщества бактерий цикла серы в донных осадках Херсонесской бухты (г. Севастополь)

Пары праймеров	Целевой ген (позиция участка)	Нуклеотидная последовательность, 5'–3' (ссылка)	Результаты ПЦР	
			Бактериальное обрастание	Грунт
На ген 16S pPHK				
Eub63F Eub1387R	16S pPHK <i>Bacteria</i> (63–1387)*	CAGGCCTAACACATGCAAGTC GGGCGGWTGTACAAGGC (Marchesi et al., 1998)	+	+
DFM140 DFM842	16S pPHK СРБ подгруппа 1 <i>Desulfotomaculum</i> (140–842)*	TAGMCYGGGATAACRSYKG ATACCCSCWWCWCCTAGCAC (Daly et al., 2000)	–	–
DBB121 DBB1237	16S pPHK СРБ подгруппа 2 <i>Desulfobulbus</i> (121–1237)*	CGCGTAGATAACCTGTCYTCATG GTAGKACGTGTGTAGCCCTGGTC (Daly et al., 2000)	–	–
DBM169 DBM1006	16S pPHK СРБ подгруппа 3 <i>Desulfobacterium</i> (169–1006)*	CTAATRCCGGATRAAGTCAG ATTCTCARGATGTCAAGTCTG (Daly et al., 2000)	+	–
DSB127 DSB1273	16S pPHK СРБ подгруппа 4 <i>Desulfobacter</i> (127–1273)*	GATAATCTGCCTTCAAGCCTGG CYYYYYGCRRAGTCGSTGCCCT (Daly et al., 2000)	+	+
DCC305 DCC1165	16S pPHK СРБ подгруппа 5 <i>Desulfococcus- Desulfonema- Desulfosarcina</i> (305–1165)*	GATCAGCCACACTGGRACCTGACA GGGGCAGTATCTTYAGAGTYC (Daly et al., 2000)	+	–
DSV230 DSV838	16S pPHK СРБ подгруппа 6 <i>Desulfovibrio- Desulfomicrobium</i> (230–838)*	GRGYCYGCGTYYCATTAGC SYCCGRCAYCTAGYRTYCATC (Daly et al., 2000)	+	+
На ген <i>dsrB</i>				
DSR1Fmix DSR4Rmix	<i>dsrAB</i> reductive type (187–2129)**	RKYYAYTGGAARCAYG GTRWAGCARTTGCCGCA (Pester et al., 2010)	+	+
DSRp2060F DSR4R	<i>dsrB</i> reductive type (1752–2129)**	§ CAACATCGTTCATACCCAGGG GTGTAGCAGTTACCGCA (Geets et al., 2006)	+	+
rDSRA240F rDSRB808R	<i>dsrB</i> oxidative type (172–2027)***	GGNTAYTGGAARGGNGG CCDCCNACCCADATNGC (Lenk et al., 2011)	+	+
dsrB F1a 4RSI2a	<i>dsrB</i> oxidative type (1684–2027)***	§ CACACCCAGGGCTGG CAGGCGCCGCAGCAGAT (Lever et al., 2013)	+	+

* Позиция для гена 16S рРНК *Escherichia coli* K12.

** Позиция для гена *dsrAB* *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.

*** Позиция для гена *dsrAB* *Allochromatium vinosum*.

§ GC-богатый участок 5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3' присоединяли на 5'-конец праймера для проведения ДПЭ (согласно Muvzer et al., 1993).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика донных образцов и накопительных культур бактерий цикла серы, выделенных из них. В точке отбора образцов придонная вода по данным STD-зонда имела в августе 2015 г. соленость 17.664‰ и температуру 26.18°C. Донные отложения с бактериальными обрастаниями представляли собой алевроитовый песок (преобладающий размер частиц 0.2–1.2 и 0.09–0.2 мм), а фоновые донные отложения — песок с остатками ракушки и небольшим количеством алевропелитов (преобладающий размер частиц 0.2–1.2 мм). Бактериальные обрастания сульфуретт были четко локализованы в пространстве (рис. 1а). Под верхним слоем песка, покрытого белёсой бактериальной пленкой, на глубине 10–15 см располагался газонасыщенный органогенный ил, содержащий большое количество детрита и обрывков тканей макрофитов (в основном, *Cystoseira* sp.). В процессе отбора образцов наблюдалось выделение больших газовых пузырей из ила.

Изучаемые донные осадки из района газовых высачиваний Херсонесской бухты характеризовались практически полным отсутствием окисленного слоя. В центре площадок газовыделений создаются сильно восстановленные условия (E_h = от –245 мВ до –330 мВ), способствующие активным процессам сульфатредукции и метаногенеза (при исчерпании сульфатов) и формированию газонасыщенных илов с устойчивым потоком H_2S и CH_4 в водную толщу. Обводненность и мелкодисперсность таких илов способствуют некоторому удержанию газов в осадочных слоях, однако именно разгрузка сероводорода обуславливает, по всей видимости, часто встречающееся в этом

районе отмирание макрофитов. В данном участке Херсонесской бухты физико-химическими и радиоизотопными методами ранее уже была показана высокая интенсивность процесса сульфатредукции (Пименов и соавт., 2013).

Микроскопирование выявило богатое морфологическое разнообразие микробного сообщества в отобранных нативных образцах — многочисленные нитчатые формы, вибрионы, палочковидные формы различной длины; встречались также кокки, спираиллы и бактерии с плектридиальным способом спорообразования. Ранее было сделано предположение, что основу беловато-серого бактериального обрастания сульфуретт в поверхностном слое микробных матов Херсонесской бухты составляют, вероятно, нитчатые серобактерии, морфологически схожие с представителями рода *Beggiatoa*, и такие маты могут быть отнесены к типу *Thiodendron* (Малахова и соавт., 2015). Однако в полученных нами из аналогичных микробных матов (отобранных на том же участке дна на следующий год) накопительных культурах сероокисляющих бактерий методом ДГГЭ с последующим секвенированием участков гена *dsrB* окислительного типа не было выявлено высокой гомологии с представителями серобактерий рода *Beggiatoa*.

Накопительные культуры СРБ из прибрежных донных осадков Херсонесской бухты хорошо росли и образовывали H_2S при комнатной температуре, при 4°C культуры росли медленнее. В накопительных культурах из бактериальных обрастаний при микроскопировании были выявлены толстые и тонкие длинные палочки (включая многочисленные подвижные), спираиллы и вибрионы (рис. 1б). При первых пересевах накопительных культур из донного грунта (используемого в качестве

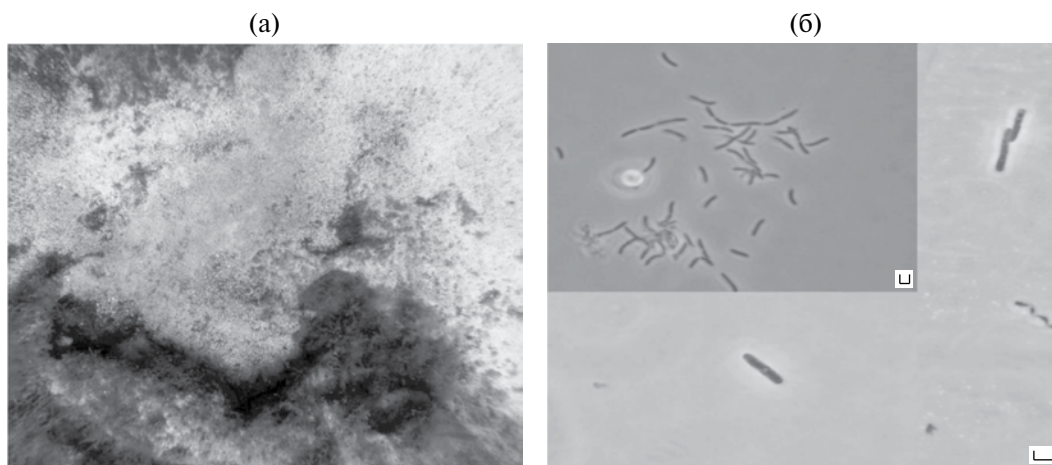


Рис. 1. Фотография морского дна в Херсонесской (Голубой) бухте г. Севастополя на глубине 5 м с бактериальными обрастаниями сульфуретт над газонасыщенными осадками (а) и микрофотография клеток преобладающей морфологии из линии накопительных культур сульфатредуцирующих бактерий, выделенных из этих обрастаний; световая фазово-контрастная микроскопия, масштабная метка — 1 мкм (б).

фонового образца) обнаружены преимущественно короткие толстые неподвижные палочки, длинные тонкие палочки, а также клетки с плектриальным типом спорообразования, спириллы и вибрионы. Стабильные полученные линии накопительных культур СРБ после нескольких пересевов на питательной среде Постгейта С с ацетатом или этанолом (по 10 мМ) в качестве доноров электронов имели клетки с четко преобладающим одинаковым морфологическим типом (преимущественно подвижные и, реже, неподвижные прямые палочки среднего размера; количество вибрионов с пересевами резко уменьшилось).

Накопительные культуры сероокисляющих бактерий из бактериальных обрастаний имели пурпурный цвет и клетки кокковидной/палочковидной формы, из фоновой точки донного грунта — были почти бесцветными, в них преобладали бактерии в виде коротких толстых палочек.

Филогенетический анализ сульфатредуцирующих бактерий в прибрежных донных осадках Херсонесской бухты. “Вложенная” ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров к участкам гена 16S рРНК основных филогенетических подгрупп СРБ показала наличие в образцах ДНК, выделенных из микробных обрастаний, генетического материала представителей родов *Desulfobacterium* (подгруппа 3 СРБ), *Desulfobacter* (подгруппа 4 СРБ), *Desulfococcus*—*Desulfonema*—*Desulfosarcina* (подгруппа 5 СРБ) и *Desulfovibrio*—*Desulfomicrobium* (подгруппа 6 СРБ). В образцах ДНК из близлежащего к этим микробным матам грунта СРБ подгрупп 3 и 5 детектированы не были, в отличие от СРБ подгрупп 4 и 6 (таблица). Достаточно схожий с упомянутыми выше микробными обрастаниями филогенетический состав СРБ, за исключением отсутствия представителей подгруппы 3, был детектирован нами ранее (неопубликованные данные) с помощью того же самого метода в сильнозагрязненных антропогенным органическим веществом газонасыщенных анаэробных донных осадках Стрелецкой бухты (горизонты 0–2, 2–4 и 4–6 см) и в донных осадках из района метановых струйных газовыделений Севастопольской бухты (горизонты 2–4 и 8–10 см) Черного моря. Причем в последнем случае представители подгруппы 6 СРБ были обнаружены только в подповерхностном горизонте 2–4 см, где наблюдался максимум скорости сульфатредукции.

В пробах ДНК, выделенных как из бактериальных обрастаний сульфуретт прибрежных газонасыщенных донных осадков, так и из близлежащего к микробным матам грунта Херсонесской бухты г. Севастополя, были получены положительные ПЦР-сигналы на наличие гена *dsrB* восстановительного типа. После проведения ДГГЭ было обнаружено, что профиль ампликонов участков гена

dsrB восстановительного типа из бактериальных обрастаний сульфуретт содержал 6 отдельных полос, а из близлежащего к микробным матам донного грунта — всего 2 отдельные полосы.

Анализ 8 транслированных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB* восстановительного типа, показал, что сульфатредуцирующие бактерии, обнаруженные нами в прибрежных донных микробных обрастаниях Херсонесской (Голубой) бухты Черного моря, имели наибольшую гомологию (92–99%) с соответствующими последовательностями гена *dsrB* культивируемых СРБ родов *Desulfovibrio* (*D. piezophilus*, *D. desulfuricans*, *D. oxyclinae*, *D. aespoeensis*, *D. longus* и др.), *Desulfatitalea* (*D. tepidiphila*), *Desulfobacter* (*D. latus*, *D. curvatus*, *D. vibrioformis*), *Desulfobacterium* (*D. autotrophicum*), а также с некультивируемыми штаммами СРБ из различных местообитаний, преимущественно морских, таких как прибрежные донные осадки Северного и Японского морей, корродирующие металлоконструкции на атлантическом побережье Франции, анаэробный ил сульфат-содержащих сточных вод из биореакторов в Дании. Транслированная аминокислотная последовательность, кодируемая геном *dsrB* восстановительного типа из близлежащего к микробным обрастаниям донного грунта, имела наибольшую гомологию (99%) к соответствующим последовательностям из донных осадков Балтийского (у побережья Швеции) и Японского морей. На филогенетической дендрограмме (рис. 2) соответствующие сиквенсы обозначены Sev1_{red.} (оказавшиеся идентичными 2 последовательности из донного грунта) и Sev2_{red.}—Sev7_{red.} (последовательности из бактериального обрастания).

Филогенетический анализ сероокисляющих (тионовых) бактерий в прибрежных донных осадках Херсонесской бухты. В пробах ДНК, выделенных как из бактериальных обрастаний сульфуретт восстановленных донных осадков, так и из близлежащего грунта Херсонесской бухты г. Севастополя, были получены положительные ПЦР-сигналы на наличие гена *dsrB* окислительного типа. Необходимо отметить, что использование пары праймеров *dsrB* F1a/4RSI2a дало наилучшие результаты при ПЦР-детекции наличия гена *dsrB* окислительного типа в исследуемых образцах по сравнению с применением смеси праймеров *dsrB* F1a-h/4RSI2a-h (Lever et al., 2013).

Поскольку, в отличие от *dsrB* восстановительного типа, получить из нативных образцов ампликоны участков гена *dsrB* окислительного типа в достаточных для проведения ДГГЭ концентрациях оказалось затруднительно, было решено вначале вырастить накопительные культуры сероокисляющих бактерий (с использованием в качестве посевного материала как микробных обрастаний,

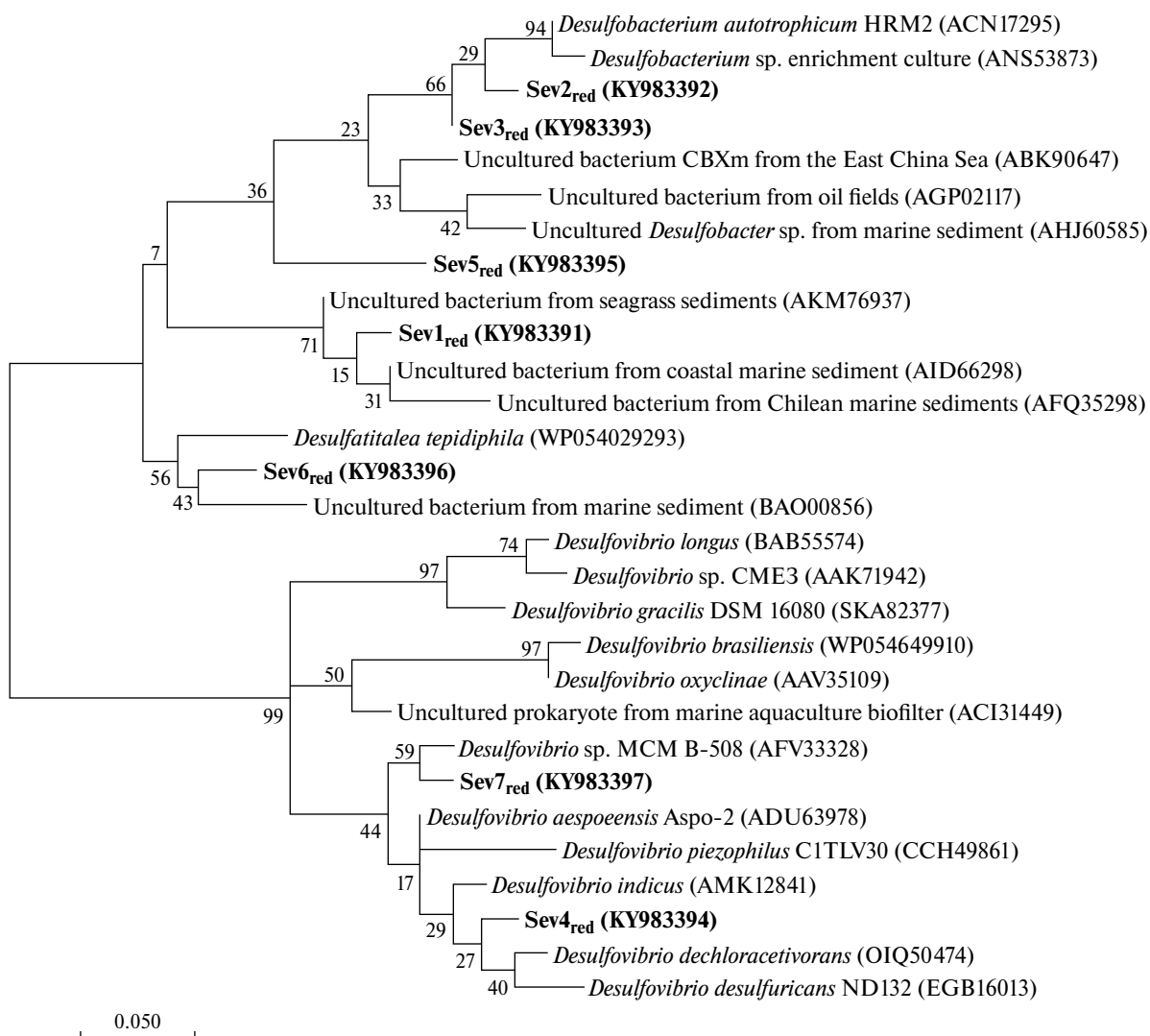


Рис. 2. Филогенетическая дендрогрaмма сульфатредуцирующих бактерий, полученная путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB* восстановительного типа. Полужирным шрифтом отмечены последовательности, полученные в ходе секвенирования участков гена *dsrB* после проведения ДГГЭ продуктов амплификации гена *dsrB* восстановительного типа из прибрежных газонасыщенных донных осадков Херсонесской бухты. Масштабная метка соответствует 5% расчетной дивергенции последовательностей.

так и донного грунта), и провести выделение ДНК уже из полученных культур. Этот способ оказался успешным.

После разделения посредством ДГГЭ продуктов амплификации участков гена *dsrB* окислительного типа с использованием ДНК-матрицы из накопительных культур сероокисляющих бактерий (посевной материал – бактериальные обрастания) было выявлено в общей сложности 8 отдельных полос. На ДГГЭ-профиле по гену *dsrB* окислительного типа накопительных культур сероокисляющих бактерий из донного грунта была видна лишь 1 полоса. Это свидетельствует о большем филогенетическом разнообразии бактерий цикла серы именно в бактериальных обрастаниях по сравнению

с донным грунтом за пределами микробных матов и газовых высачиваний.

Проанализированные 8 транслированных аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB* окислительного типа сероокисляющих бактерий из бактериальных обрастаний в Херсонесской бухте, обладали наибольшей гомологией (90–99%) к β -субъединице диссимиляционной (би)сульфитредуктазы представителей сероокисляющих (тионовых) бактерий, относящихся к родам *Thiocapsa* (*T. marina*, *T. roseopersicina*), *Thiobaca* (*T. trueperi*), *Thioflavococcus* (*T. mobilis*) и *Thiorhodococcus* (*T. drewsii*), а также к *Marichromatium gracile*. Транслированная аминокислотная последовательность, кодируемая геном *dsrB* окислительного типа

из близлежащего к сульфуреттам донного грунта, имела также относительно невысокую гомологию (85–89%) к соответствующим последовательностям *Achromatium* spp., *Thiohalocapsa* spp. и некультивируемых сероокисляющих бактерий из донных осадков солончаков на острове Плам (побережье Атлантического океана, штат Массачусетс, США). На филогенетической дендрограмме (рис. 3) соответствующие сиквенсы обозначены Sev1_{ок.} (оказавшиеся идентичными 1 последовательности из донного грунта и 2 последовательности из микробного обрастания), Sev2_{ок.} (оказавшиеся идентичными 4 последовательности из микробного обрастания), Sev3_{ок.}–Sev4_{ок.} (2 последовательности из микробного обрастания).

Интересно, что представители трех из, по меньшей мере, 13 филогенетических линий уровня семейства по гену *dsrAB* восстановительного типа, не имеющих к настоящему времени ни одного точно идентифицированного и культивируемого штамма, были детектированы именно в морских экосистемах (Müller et al., 2015). На границе сульфатных и метановых илов глубоководных донных осадков Черного моря, где численность СРБ была максимальной, составляя 30% от всех микроорганизмов, доминирующей подгруппой СРБ на основе библиотеки клонов гена *dsrAB* являлась *Desulfobacteraceae* (Leloup et al., 2007). Исследованиями с помощью CARD-FISH было показано, что в гидрокарбонатных постройках в зонах морских

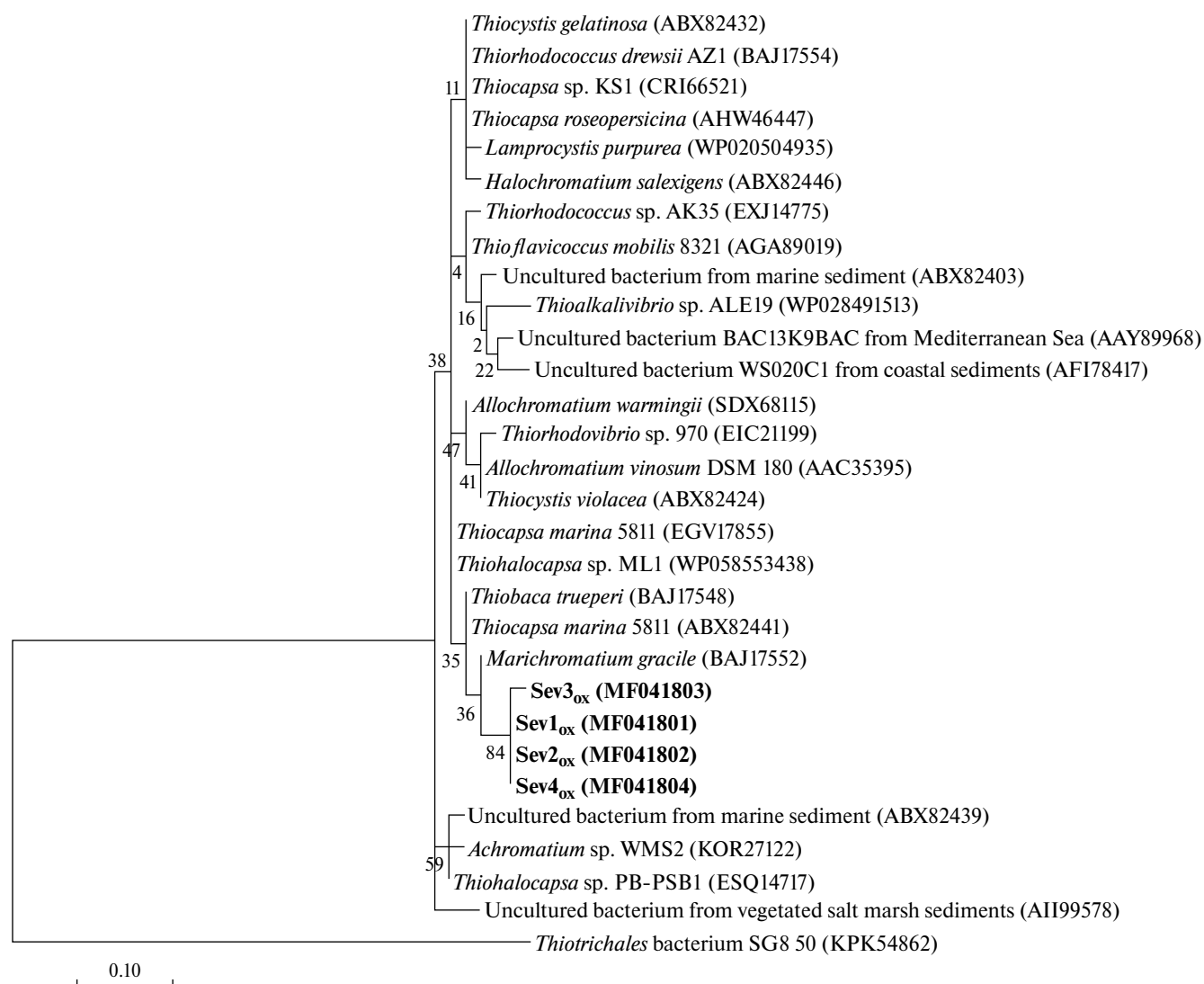


Рис. 3. Филогенетическая дендрограмма сероокисляющих бактерий, полученная путем сравнительного анализа аминокислотных последовательностей, кодируемых геном *dsrB* окислительного типа. Полужирным шрифтом отмечены последовательности, полученные в ходе секвенирования участков гена *dsrB* после проведения ДГГЭ продуктов амплификации гена *dsrB* окислительного типа из прибрежных газонасыщенных донных осадков Херсонесской бухты. Масштабная метка соответствует 10% расчетной дивергенции последовательностей.

метановых сипов, включая черноморские, преобладают СРБ подгруппы *Desulfosarcina–Desulfococcus* (Kleindienst et al., 2012), что вполне соответствует и нашим данным анализа сообществ СРБ по гену 16S рРНК в прибрежных донных осадках севастопольских бухт. Филогенетический состав сероокисляющего компонента сообществ микроорганизмов в микробных матах различных районов прибрежной зоны Крымского полуострова, вне всякого сомнения, требует дальнейшего пристального изучения.

Авторы искренне благодарны д.б.н., профессору, академику РАН В.Н. Егорову (Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского Российской академии наук) за неоценимую помощь в организации морской экспедиции для отбора экспериментальных образцов, а также директору ИМБИ РАН — д.б.н., профессору Гулину С.Б. за искреннее внимание к данной работе и организационную поддержку.

Работа финансировалась из средств грантов РФФИ № 14-04-90400 и 17-04-00023, а также по госзаданию 0104-2018-0030.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Канапацкий Т.А., Захарова Е.Е., Менько Е.В., Русанов И.И., Пименов Н.В. Изучение состава сообществ сульфатредуцирующих бактерий в аэробных водах и зоне хемоклина Черного моря с использованием метода FISH // *Микробиология*. 2011. Т. 80. № 1. С. 112–120. Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kanapatskii T.A., Zakharova E.E., Men'ko E.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Investigation of the sulfate-reducing bacterial community in the aerobic water and chemocline zone of the Black Sea by the FISH technique // *Microbiology (Moscow)*. 2011. V. 80. P. 108–116.
- Егоров В.Н., Пименов Н.В., Малахова Т.В., Канапацкий Т.А., Артемов Ю.Г., Малахова Л.В. Биогеохимические характеристики распределения метана в воде и донных осадках в местах струйных газовыделений в акватории Севастопольских бухт // *Морск. экол. журнал*. 2012. Т. XI. № 3. С. 41–52.
- Лысенко В., Шик Н. Современные процессы образования карбонатов, связанные с углеводородной дегазацией, в бухте Ласпи (Южный берег Крыма) // *Пространство и Время*. 2013. Т. 2. № 12. С. 151–157.
- Малахова Т.В., Канапацкий Т.А., Егоров В.Н., Малахова Л.В., Артёмов Ю.Г., Евтушенко Д.Б., Гулин С.Б., Пименов Н.В. Микробные процессы и генезис струйных метановых газовыделений прибрежных районов Крымского полуострова // *Микробиология*. 2015. Т. 84. № 6. С. 743–752. Malakhova T.V., Kanapatskii T.A., Egorov V.N., Malakhova L.V., Artemov Yu.G., Evtushenko D.B., Gulins S.B., Pimenov N.V. Microbial processes and genesis of methane gas jets in the coastal areas of the Crimean Peninsula // *Microbiology (Moscow)*. 2015. V. 84. P. 838–845.
- Пименов Н.В., Егоров В.Н., Канапацкий Т.А., Малахова Т.В., Артёмов Ю.Г., Сигалевич П.А., Малахова Л.В. Микробные процессы круговорота метана и сульфатредукция в осадках акватории Севастопольских бухт // *Микробиология*. 2013. Т. 82. № 5. С. 614–624. Pimenov N.V., Egorov V.N., Kanapatskii T.A., Malakhova T.V., Artemov Ju.G., Sigalevich P.A., Malakhova L.V. Sulfate reduction and microbial processes of the methane cycle in the sediments of the Sevastopol Bay // *Microbiology (Moscow)*. 2013. V. 82. P. 618–627.
- Пименов Н.В., Иванова А.Е. Анаэробное окисление метана и сульфатредукция в бактериальных матах на коралловидных карбонатных постройках в Черном море // *Микробиология*. 2005. Т. 74. № 3. С. 420–429. Pimenov N.V., Ivanova A.E. Anaerobic methane oxidation and sulfate reduction in bacterial mats of coral-like carbonate structures in the Black Sea // *Microbiology (Moscow)*. 2005. V. 74. P. 362–370.
- Ткешелашвили Г.И., Егоров В.Н., Мествиришвили Ш.А., Пархаладзе Г.Ш., Гулин М.Б., Гулин С.Б., Артемов Ю.Г. Метановые газовыделения со дна Черного моря в приустьевой зоне реки Супса у побережья Грузии // *Геохимия*. 1997. Т. 35. № 3. С. 331–335. Tkeshelashvili G.I., Egorov V.N., Mestvirishvili Sh.A., Parkhaladze G.Sh., Gulins M.B., Gulins S.B., Artemov Yu.G. Methane emissions from the Black Sea bottom in the mouth zone of the Supsa River at the coast of Georgia // *Geochem. Int.* 1997. V. 35. P. 284–288.
- Amouroux D., Roberts G., Rapsomanikis S., Andreae M.O. Biogenic gas (CH₄, N₂O, DMS) emission to the atmosphere from nearshore and shelf waters of the north-western Black Sea // *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 2002. V. 54. P. 575–587.
- Bagwell C.E., Formolo M., Ye Q., Yeager C.M., Lyons T.W., Zhang C.L. Direct analysis of sulfate-reducing bacterial communities in gas hydrate-impacted marine sediments by PCR-DGGE // *J. Basic Microbiol.* 2009. V. 49. P. 87–92.
- Blazejak A., Schippers A. Real-time PCR quantification and diversity analysis of the functional genes *aprA* and *dsrA* of sulfate-reducing prokaryotes in marine sediments of the Peru continental margin and the Black Sea // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. P. 253–263.
- Boetius A., Ravensschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jorgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane // *Nature*. 2000. V. 407. P. 623–627.
- Daly K., Sharp R.J., McCarthy A.J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria // *Microbiology (SGM)*. 2000. V. 146. P. 1693–1705.
- Dimitrov L. Contribution to atmospheric methane by natural gas seepages on the Bulgarian continental shelf // *Cont. Shelf Res.* 2002. V. 22. P. 2429–2442.
- Geets J., Borremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D., Vanbroekhoven K. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria // *J. Microbiol. Meth.* 2006. V. 66. P. 194–205.

- Hoehler T.M., Alperin M.J., Albert D.B., Martens C.S. Field and laboratory studies of methane oxidation in an anoxic marine sediments: evidence for a methanogen-sulfate reducer consortium // *Global Geochem. Cycles*. 1994. V. 8. P. 451–463.
- Hovland M., Judd A.G., Burke Jr.R.A. The global flux of methane from shallow submarine sediments // *Chemosphere*. 1993. V. 26. P. 559–578.
- Ivanov M.V., Pimenov N.V., Rusanov I.I., Lein A.Y. Microbial processes of the methane cycle at the north-western shelf of the Black Sea // *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 2002. V. 54. P. 589–599.
- Jessen G.L., Lichtschlag A., Struck U., Boetius A. Distribution and composition of thiotrophic mats in the hypoxic zone of the Black Sea (150–170 m water depth, Crimea margin) // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 1011–1024.
- Jørgensen B.B., Bang M., Blackburn T.H. Anaerobic mineralization in marine sediments from the Baltic Sea–North Sea transition // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1990. V. 59. P. 39–54.
- Judd A.G. Natural seabed gas seeps as sources of atmospheric methane // *Environ. Geol.* 2004. V. 46. P. 988–996.
- Kleindienst S., Ramette A., Amann R., Knittel K. Distribution and *in situ* abundance of sulfate-reducing bacteria in diverse marine hydrocarbon seep sediments // *Environ. Microbiol.* 2012. V. 14. P. 2689–2710.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. P. 1870–1874.
- Leloup J., Loy A., Knab N.J., Borowski C., Wagner M., Jørgensen B.B. Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 131–142.
- Lenk S., Arnds J., Zerjatke K., Musat N., Amann R., Mussmann M. Novel groups of *Gammaproteobacteria* catalyze sulfur oxidation and carbon fixation in a coastal, intertidal sediment // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13. P. 758–774.
- Lever M.A., Rouxel O., Alt J.C., Shimizu N., Ono S., Coggon R.M. et al. Evidence for microbial carbon and sulfur cycling in deeply buried ridge flank basalt // *Science*. 2013. V. 339. P. 1305–1308.
- Loy A., Duller S., Baranyi C., Mussmann M., Ott J., Sharon I., Bèjà O., Le Paslier D., Dahl C., Wagner M. Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 289–299.
- Marchesi J.R., Sato T., Weightman A.J., Martin T.A., Fry J.C., Hiom S.J., Dymock D., Wade W.G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. V. 64. P. 795–799.
- Michaelis W., Seifert R., Nauhaus K., Treude T., Thiel V., Blumenberg M., Knittel K., Gieseke A., Peterknecht K., Pape T., Boetius A., Amann R., Jørgensen B.B., Widdel F., Peckmann J., Pimenov N.V., Gulin M.B. Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane // *Science*. 2002. V. 297. P. 1013–1015.
- Müller A.L., Kjeldsen K.U., Rattei T., Pester M., Loy A. Phylogenetic and environmental diversity of DsrAB-type dissimilatory (bi)sulfite reductases // *ISME J.* 2015. V. 9. P. 1152–1165.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. V. 59. P. 695–700.
- Neretin L.N., Abed R.M., Schippers A., Schubert C.J., Kohls K., Kuypers M.M. Inorganic carbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. P. 3019–3024.
- Pester M., Bittner N., Deevong P., Wagner M., Loy A. A “rare biosphere” microorganism contributes to sulfate reduction in a peatland // *ISME J.* 2010. V. 4. P. 1591–1602.
- Schippers A., Kock D., Höft C., Köweker G., Siebert M. Quantification of microbial communities in subsurface marine sediments of the Black Sea and off Namibia // *Front. Microbiol.* 2012. V. 3. P. 16–26.
- Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulfur metabolism in *Thiorhodaceae*. I. Quantitative measurements in growing cells of *Cromatium okenii* // *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 1964. V. 30. P. 225–238.
- Vetriani C., Tran H.V., Kerkhof L.J. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. P. 6481–6488.
- Wrede C., Heller C., Reitner J., Hoppert M. Correlative light/electron microscopy for the investigation of microbial mats from Black Sea Cold Seeps // *J. Microbiol. Methods*. 2008. V. 73. P. 85–91.

Phylogenetic Diversity of the Sulfur Cycle Bacteria in the Bottom Sediments of the Chersonesus Bay

A. L. Bryukhanov^{1,2,*}, M. A. Vlasova², T. V. Malakhova³, A. A. Perevalova², and N. V. Pimenov²

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

²Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

³Kovalevsky Institute of Marine Biological Research, Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russian Federation

*E-mail: brjuchanov@mail.ru

Received September 19, 2017

Abstract — The Black Sea is the largest meromictic basin, in the bottom sediments of which a powerful biogenic process of sulfide production occurs. The goal of the present work was to obtain data on phylogenetic diversity of the sulfur cycle microorganisms (sulfate-reducing and sulfur-oxidizing bacteria) in the Black Sea coastal gas-saturated bottom sediments. The samples were collected in the Chersonesus (Blue) Bay near Sevastopol from whitish bacterial mats of sulfuretes, and from the upper layer of the nearby seabed. Using DNA isolated from the native samples and obtained enrichment cultures, PCR analysis was performed with oligonucleotide primers specific to the fragments of the 16S rRNA genes of the main subgroups of sulfate-reducing bacteria (SRB) and to the fragments of the *dsrB* gene (both reductive and oxidative types), encoding the β -subunit of dissimilatory (bi)sulfite reductase, the key enzyme in the sulfur cycle, inherent in both sulfate-reducing and sulfur-oxidizing microorganisms. The presence of 16S rRNA gene fragments specific to the genera *Desulfobacterium*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*—*Desulfonema*—*Desulfosarcina*, and *Desulfovibrio*—*Desulfomicrobium* was detected in the DNA samples isolated from coastal bottom bacterial mats. Usage of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) with subsequent sequencing of reamplified *dsrB* gene fragments revealed that according to deduced amino acid sequences encoded by the *dsrB* gene (reductive type), SRB from the coastal gas-saturated bottom sediments of the Black Sea had the highest homology (92–99%) with the *dsrB* gene of cultured SRB belonging to the genera *Desulfovibrio*, *Desulfatitalea*, *Desulfobacter*, and *Desulfobacterium*, as well as with uncultured SRB strains from various marine habitats, such as bottom sediments of the Northern and Japanese Seas. Deduced amino acid sequences encoded by the oxidative *dsrB* gene had the highest homology (90–99%) with the relevant sequences of the genera *Thiocapsa*, *Thiobaca*, *Thioflavicoccus*, and *Thiorhodococcus*.

Keywords: sulfate-reducing bacteria, sulfur-oxidizing (thionic) bacteria, the Black Sea, bottom sediments, microbial mats, microbial communities, dissimilatory (bi)sulfite reductase, *dsrB* gene.