

## **Molecular genetic identification of planktonic bacteria in the Yenisei River basin and experimental study of their biogeochemical functions**

Each species has its unique and intrinsic geochemical function, i.e. it consumes certain types of energy and matter, and it synthesizes other specific substances including its own biomass. In aquatic ecosystems, research of species composition and functions of certain types of producers and consumers such as algae, invertebrates and fish, has been successfully conducted for a long time. However, the studies of decomposers have until recently been limited by a lack of adequate research methods.

In pelagic ecosystems, decomposers are primarily represented by planktonic bacteria. Light microscopy and cultivation on solid selective media have been principal methods of bacterial species identification for a long time. However, the species with characteristic morphology could only be identified microscopically. The culture method also has significant limitations since no more than 1% of free-living planktonic bacteria grow on the media. Thus, until recently, the species composition of the vast majority of aquatic bacteria has remained virtually unknown. Obviously, if it is impossible to identify an organism and distinguish between species, one will not be able to determine species-specific functions of an individual species in an ecosystem. In the last two decades, these limitations have been overcome with the advent of molecular genetic methods for bacterial species identification.

Since then the bacterial composition of oceans, seas and freshwater reservoirs has been extensively studied. However, watercourses, including major rivers, attracted much less attention. The most effective method of describing taxonomic composition of natural bacterial communities is to determine the nucleotide sequence of 16S rRNA genes by next-generation sequencing. There are only a few studies of composition and diversity of bacteria in rivers based on next-generation sequencing in literature. Moreover, these studies were conducted on short stretches of rivers and did not aim to identify biodiversity patterns of microbial communities along the river.

Research on biogeochemical functions of natural microbial communities has been conducted by many authors, but most studies did not aim to determine what species of bacteria consumed a particular substance, and they defined the functions of a bacterial community as a whole.

The purpose of this work was to determine the species composition of planktonic bacteria in the Yenisei River basin by molecular genetic techniques including next-

generation sequencing, and to estimate their biogeochemical functions using the experimental study of bacterial consumption of certain types of specific organic substances. To achieve this goal the following objectives were set:

- 1) studying the biodiversity of bacteria in the Yenisei River by next-generation sequencing.
- 2) identifying planktonic bacteria consuming a certain range of amino acids: the Bugach reservoir case study.
- 3) studying the seasonal dynamics of bacterial response to the addition of various amino acids using experimental mesocosms based on water samples from the Bugach reservoir.

For the first time, the bacterial biodiversity in the Yenisei River over the length of about 1800 km was studied. Three thousand and twenty two operational taxonomic units (OTUs) of planktonic bacteria were found in the Yenisei River. The alpha-diversity of bacterial communities and the relative proportion of Cyanobacteria reached maximum values in the middle of the studied section.

It was found that there were three bacterial assemblages differing significantly in the species composition and inhabiting different parts of the Yenisei River located in the mountain taiga (the upper part of the river), the lowland taiga (middle portion) and the tundra (lower portion). Presumably these assemblages were formed as a result of biogeochemical influence of the surrounding landscape. The dominant taxa of each assemblage specialized in the consumption of various organic substances. The obtained results can be used for integrated environmental monitoring of the Yenisei River and to determine the contribution of the ecosystem of the largest Arctic river to the global sink of carbon in the biosphere.

The bacteria consuming lysine and glycine in the Bugach reservoir were identified with the use of non-sterile cultivation in experimental mesocosms. The obtained data indicated that different species of planktonic bacteria specialized in the consumption of individual amino acids. The response of summer bacterial community to added lysine was stable and repeated in different years. In contrast to summer experiments, the addition of lysine in spring and fall did not cause significant changes in quantitative and qualitative composition of pelagic bacterial community. This should be considered when assessing the ability of water ecosystem in biological self-purification from organic pollution.

## **Определение видового состава планктонных бактерий бассейна реки Енисей молекулярно-генетическими методами и экспериментальное исследование их биогеохимических функций**

Каждый биологический вид в природе выполняет уникальную, только ему присущую биогеохимическую функцию, т.е. потребляет определенные виды вещества и энергии и синтезирует из них другие специфические вещества, включая собственную биомассу. В водных экосистемах определение видового состава и функциональной роли отдельных видов продуцентов и консументов – водорослей, беспозвоночных животных и рыб – успешно осуществляется с момента зарождения гидробиологии. Вместе с тем, изучение такого важнейшего звена водных экосистем, как редуценты, было до недавнего времени ограничено отсутствием адекватных методов исследований.

В пелагических экосистемах звено редуцентов, как известно, представлено бактериопланктоном. Основными методами определения видовой принадлежности бактерий в течение длительного периода были световая микроскопия и культивирование на твердых селективных средах. Однако под микроскопом удавалось идентифицировать лишь виды с характерной морфологией. Метод культивирования тоже имеет значительные ограничения, поскольку на средах вырастает не более 1% водных бактерий, определяемых прямым счетом. Таким образом, до недавнего времени видовой состав подавляющего большинства видов водных бактерий оставался практически неизвестным.

Очевидно, что если невозможно определить видовую принадлежность организма и отличить один вид от другого, то и не удастся и выявить видоспецифичные функции каждого вида в экосистеме. Эти ограничения были преодолены с появлением в последние два десятилетия молекулярно-генетических методов определения видовой принадлежности бактерий.

С тех пор бактериальный состав толщи воды океанов, морей и пресноводных водоемов активно изучался. Тем не менее, водотокам, в том числе крупным рекам, уделялось гораздо меньше внимания. Самым высокопроизводительным на сегодняшний день является метод определения нуклеотидной последовательности гипервариабельных участков генов 16S рРНК с помощью секвенирования следующего поколения (NGS – «next-generation sequencing»). В литературе имеется лишь несколько примеров исследований состава и разнообразия бактерий в реках

на основе NGS. Эти исследования были проведены на коротких отрезках реки и не были направлены на выявление закономерностей распределения микробного биоразнообразия вдоль течения реки. Очевидно, что необходимо значительно больше исследований, чтобы определить разнообразие и структуру бактериальных сообществ, содержащихся в реках.

Целью настоящей работы было определить видовой состав планктонных бактерий бассейна реки Енисей молекулярно-генетическими методами, включая секвенирование следующего поколения, и оценить их биогеохимические функции с помощью экспериментального исследования потребления отдельными видами бактериопланктона конкретных органических веществ.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) Изучить биоразнообразие бактериопланктона р. Енисей методом секвенирования следующего поколения.

2) Молекулярно-генетическими методами идентифицировать бактериопланктон, потребляющий определённый спектр аминокислот, на примере водохранилища Бугач.

3) Методом экспериментальных микроэкосистем, созданных на основе проб из водохранилища, изучить сезонную динамику отклика видовой состава бактериопланктона на добавление различных аминокислот.

Обнаружено, что в состав бактериопланктона р. Енисей входит более 3000 ОТЕ. Альфа-разнообразие (видовое богатство) сообществ бактериопланктона р. Енисей было максимальным в средней части изученного участка реки. Вниз по течению, при переходе от горной тайги к равнинной тайге и лесотундре в области вечной мерзлоты, видовой состав бактериальных сообществ в речной воде изменялся в соответствии со сменой биома, вероятно, благодаря влиянию притоков, несущих собственные сообщества бактериопланктона, сформировавшиеся в этих биомах. Различные бактериальные сообщества могут вносить разный вклад в цикл углерода в реке. Определение зависимости между биоразнообразием (видовым составом) речных бактерий и их биогеохимической функцией будет следующим важным шагом в изучении роли рек в глобальных циклах углерода.

С использованием нестерильного культивирования в экспериментальных микроэкосистемах были идентифицированы бактерии, потреблявшие лизин и глицин в водохранилище Бугач. Полученные данные показывают, что различные виды планктонных бактерий специализируются на потреблении отдельных

аминокислот. Реакция летнего бактериального сообщества на добавки лизина была стабильной и повторялась в разные годы. В отличие от летних экспериментов, добавление лизина весной и осенью не вызывало существенных изменений в количественном и качественном составе пелагического бактериального сообщества. Это следует учитывать при оценке способности водных экосистем к биологическому самоочищению от органических веществ.