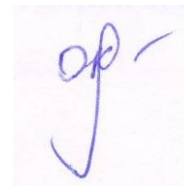


*На правах рукописи*



Колмакова Олеся Владимировна

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА ПЛАНКТОННЫХ БАКТЕРИЙ  
БАССЕЙНА РЕКИ ЕНИСЕЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМИ  
МЕТОДАМИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ  
БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

03.02.10 – гидробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Красноярск  
2015

Работа выполнена на кафедре водных и наземных экосистем Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Сибирский федеральный университет» и в лаборатории экспериментальной гидроэкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биофизики Сибирского отделения РАН» (г. Красноярск)

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор  
Гладышев Михаил Иванович

**Официальные оппоненты:** Скарлато Сергей Орестович, доктор биологических наук, ФГБУН «Институт цитологии РАН», лаборатория экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, главный научный сотрудник

Косолапов Дмитрий Борисович, кандидат биологических наук, ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН», лаборатория микробиологии, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:** ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Улан-Удэ

Защита диссертации состоится «02» апреля 2015 г. в 14-00 час. на заседании диссертационного совета ДМ 212.099.15 на базе Сибирского федерального университета по адресу: 660041, г. Красноярск, пр. Свободный, 79, ауд. Р8-06.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Сибирского федерального университета <http://www.sfu-kras.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета



Гаевский Николай Александрович

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** По образному выражению В.И. Вернадского, каждый биологический вид в природе выполняет уникальную, только ему присущую "геохимическую работу", 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 1-3% свободноживущих планктонных 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 не удастся и выявить видоспецифичные функции каждого вида в экосистеме. В связи с проблематичностью идентификации отдельных видов первоначально выделялись целые группы бактерий, предположительно объединённые общей биогеохимической функцией. Однако роль отдельных видов в деструкции органических веществ оставалась неизвестной в связи с трудностями видовой идентификации бактериопланктона. Эти ограничения были преодолены с появлением в последние два десятилетия молекулярно-генетических методов определения видовой принадлежности бактерий.

**Степень разработанности темы исследования.** Океаны, моря и пресноводные водоёмы активно изучались на предмет идентификации бактериопланктона с момента появления соответствующих методов исследований. Однако водотоки, в том числе крупные реки, привлекали значительно меньше внимания. Самым эффективным методом описания таксономического состава природных бактериальных сообществ является определение нуклеотидной последовательности генов 16S рРНК методом секвенирования следующего поколения. В литературе имеются лишь единичные

примеры исследований состава и разнообразия бактерий в реках на основе секвенирования следующего поколения. Более того, эти исследования проводились на коротких отрезках рек и не ставили целью выявление закономерностей изменения биоразнообразия микробных сообществ вдоль течения реки.

Исследования по установлению биогеохимических функций природных микробных сообществ проводились многими авторами, однако большинство исследований не ставили своей целью определить, какие именно виды бактерий потребляют то или иное конкретное вещество, а определяли функции всего сообщества в целом.

**Цель и задачи.** Цель настоящей работы – 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 видового состава бактериопланктона на добавление различных аминокислот.

**Научная новизна.** Впервые было изучено биоразнообразие бактериопланктона в реке Енисей на участке длиной около 1800 км и сделаны выводы о его связи с окружающим ландшафтом. Экспериментально показано, что существуют виды бактериопланктона, идентифицируемые молекулярно-генетическими методами, которые специализируются на потреблении отдельных аминокислот. Установлено, что характерные изменения видового состава бактериопланктона водохранилища в ответ на добавление отдельных аминокислот происходят только летом, но отсутствуют в весенний и осенний (позднелетний) период.

**Теоретическая и практическая значимость.** Впервые определён видовой состав бактериопланктона р. Енисей на участке длиной 1800 км, включающий 3022 вида (операционных таксономических единицы), из них 552 новых вида. Установлено, что в верхнем, среднем и нижнем участках реки функционируют три различных бактериальных сообщества, предположительно вносящих различный вклад в формирование «стока углерода». Полученные результаты

могут быть использованы для комплексного экологического мониторинга р. Енисей и определения вклада экосистемы этой крупнейшей реки Арктического бассейна в глобальные потоки углерода в биосфере.

Установлено, что отклик сообщества бактериопланктона водохранилища на добавление различных веществ существенно зависит от сезона. Полученный результат имеет большое значение для прогноза способности водоёмов к биологическому самоочищению от органических загрязнений.

**Положения, выносимые на защиту:**

1) В р. Енисей выделяются три сообщества бактериопланктона, достоверно отличающиеся по видовому составу и населяющие участки реки, расположенные в горной тайге, равнинной тайге и тундре (лесотундре).

2) В бактериопланктоне водохранилища существуют виды, имеющие узкую специализацию в потреблении отдельных аминокислот.

3) Участие бактериопланктона водохранилища в утилизации отдельных органических веществ существенно зависит от сезона, что необходимо учитывать при оценке способности экосистемы водоёма к биологическому самоочищению от органического загрязнения.

**Апробация результатов.** По материалам работы опубликовано 5 статей в научных журналах из списка ВАК, из них 4 – в журналах с импакт-фактором Web of Science. Материалы диссертации докладывались на V Международной конференции по промышленной, прикладной микробиологии и микробиологии окружающей среды, BioMicroWorld-2013 (Мадрид, Испания, 2013); XV Школке-конференции молодых ученых «Биология внутренних вод» (пос. Борок Ярославской обл., 2013); конкурсах-конференциях научных работ молодых учёных Института биофизики СО РАН (Красноярск, 2012-2014) и Красноярского научного центра (Красноярск, 2014); XV Международном симпозиуме по микробной экологии, ISME (Сеул, Республика Корея, 2014); XI Съезде Гидробиологического общества при РАН (Красноярск, 2014); Конкурсе на лучшую научную работу студентов и молодых учёных федеральных университетов (Ростов-на-Дону, 2014); семинарах лаборатории экспериментальной гидроэкологии Института биофизики СО РАН (Красноярск, 2011-2014).

**Благодарности.** Автор благодарит сотрудников лаборатории молекулярных биотехнологий Института цитологии и генетики СО РАН А.С. Розанова и С.Е. Пельтека за помощь в получении библиотеки ампликонов гена 16s рРНК.

**Структура работы.** Работа изложена на 120 страницах машинописного текста и включает введение, 4 главы, заключение, выводы и список цитируемой литературы (146 источников). Диссертация содержит 14 рисунков и 9 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Секвенирование следующего поколения и современные методы определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона (обзор литературы)**

В главе представлен обзор литературы о методах определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона, обсуждаются их преимущества и недостатки, а также обосновывается выбор метода для проведения экспериментов в микроэкосистемах с добавками питательных веществ и последующим фингерпринтингом сообществ для целей данного исследования. Приводится характеристика самого высокопроизводительного на сегодняшний день метода определения нуклеотидных последовательностей ДНК – секвенирования следующего поколения.

### **Глава 2. Материал и методы исследования**

Пробы воды для определения видового состава бактериопланктона собирали на реке Енисей, которая является самой длинной (4803 км) и наиболее полноводной (расход воды 636 км<sup>3</sup>/год) рекой из всех рек, впадающих в Северный Ледовитый океан. Также среди рек, впадающих в Северный Ледовитый океан, Енисей имеет самый большой объём стока растворённого и взвешенного органического углерода. Было изучено биоразнообразие бактериальных сообществ реки Енисей на участке длиной приблизительно 1800 км с помощью определения нуклеотидной последовательности гипервариабельного участка V3-V4 гена 16S рРНК методом секвенирования следующего поколения и расчета индекса биоразнообразия. Пробы воды были собраны во время экспедиции в июне 2012 г. Десять пробоотборных трансект располагались выше и ниже устьев крупных притоков р. Енисей: р. Ангара (Т1, Т2), Подкаменная Тунгуска (Т3, Т4), Нижняя Тунгуска (Т5, Т6), Курейка (Т7, Т8), Большая Хета (Т9, Т10). На каждой трансекте отбирали по три интегральных по глубине пробы: в центре русла и около каждого из берегов. Численность бактерий в пробах определяли с помощью системы фотодокументации микроскопа Axioscope 40 (Zeiss, Германия), в режиме эпифлуоресценции.

ДНК из проб выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) и получали библиотеку ампликонов для последующего секвенирования. Для секвенирования с двух концов была использована платформа MiSeq (Illumina, США). Биоинформатический анализ полученных данных проводили и коэффициенты биоразнообразия считали с помощью конвейерного программного обеспечения QIIME (Caporaso et al., 2010), статистический – с помощью программы STATISTICA (StatSoft Inc., США) и

программного пакета Community Analysis Package (Pisces Conservation Ltd, Великобритания).

Экспериментальное исследование биогеохимических функций бактериопланктона проводили на природном бактериальном сообществе из эвтрофного водохранилища Бугач (г. Красноярск). В качестве тестовых добавок для гетеротрофного бактериопланктона были выбраны аминокислоты, поскольку эти вещества в больших количествах выделяются из растущего и отмирающего фито- и зоопланктона и являются одним из наиболее предпочитаемых бактериями органических компонентов. Всего в разное время было проведено 5 экспериментов (таблица 1). Для экспериментов были выбраны три аминокислоты: глицин, лизин и аргинин, поскольку они являлись характерными кислотами в общем пуле аминокислот водохранилища, и притом сезонная динамика концентраций этих кислот в водохранилище достоверно отличалась. Более того, источниками этих аминокислот служили различные организмы экосистемы водохранилища. Эксперименты проводили в лабораторных микроэкосистемах (МЭС) объемом 10 л. Пробы воды из водохранилища, содержащие естественный планктон, инокулировали в МЭС. Режим освещения и температура воды имитировали естественные значения. При заполнении МЭС брали исходную пробу воды, далее после внесения добавки ежедневно в течение 5 суток отбирали по 100 мл воды для анализа состава бактериопланктона. В экспериментах III и V ежедневно определяли концентрацию соответствующих добавленных аминокислот в экспериментальных МЭС.

Таблица 1 – Список экспериментов в микроэкосистемах с добавками аминокислот

№	Время проведения	Добавки		
		МЭС 1	МЭС 2	МЭС 3
I	30 июня – 6 июля 2004 г.	лизин 100 мг/л	контроль	глицин 100 мг/л
II	17 – 23 августа 2005 г.	лизин 100 мг/л	контроль	аргинин 100 мг/л
III	17 – 23 мая 2006 г.	лизин 100 мг/л	контроль	глицин 100 мг/л
IV	31 июля – 5 августа 2009 г.	лизин 1 мг/л	лизин 100 мг/л	лизин 10 мг/л
V	14 – 20 мая 2013 г.	лизин 1 мг/л	контроль	лизин 5 мг/л

Бактериопланктон из каждой пробы концентрировали фильтрованием и выделяли геномную ДНК по методу Бострёма (Boström et al., 2004). Далее амплифицировали фрагменты гена 16S рРНК с помощью полимеразной цепной реакции с праймерами GC-341F и 926R. ПЦР-продукты использовали для анализа методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ), с последующей денситометрической обработкой цифровых изображений

полученных гелей в пакете программ AlphaEase (Alpha Innotech Corp.). Для оценки разнообразия бактериального сообщества вычисляли индекс Шеннона  $H = -\sum p_i(\log_2 p_i)$ , где  $p_i$  – относительная плотность  $i_{\text{той}}$  полосы в образце (Dunbar *et al.*, 1999). Кластерный анализ по методу одного звена провели согласно Джефферсу (Jeffers, 1978) с использованием эвклидовых расстояний. Все вычисления выполняли с помощью программы STATISTICA, версия 9 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Представляющие интерес полосы ДНК выделяли из полиакриламидного геля, ре-амплифицировали фрагменты гена 16S рРНК и далее клонировали и определяли их нуклеотидные последовательности методом секвенирования по Сэнгеру. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК сравнивали с последовательностями из баз данных GenBank и EMBL с помощью онлайн-сервиса BLAST [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>]. Далее были построены филогенетические деревья с помощью программного обеспечения Mega [URL: <http://www.megasoftware.net/>]. Использовали методы присоединения ближайших соседей и максимального правдоподобия с 1000 повторов бутстреп-анализа.

### Глава 3. Биоразнообразие и численность бактериопланктона Енисея

В целом численность бактериопланктона сравнительно мало варьировала на всём протяжении изученного нами среднего и нижнего течения р. Енисей (Рис. 1) и была близка к значениям, характерным для других рек. В ходе молекулярно-генетического анализа было выполнено 240500 прочтений нуклеотидных последовательностей и идентифицировано 3022 операционных таксономических единицы (ОТЕ). Следует отметить, что единственный молекулярно-генетический анализ бактериопланктона Енисея, предшествующий нашей работе, и проведённый только в устье, основывался всего лишь на 80 прочтениях нуклеотидных последовательностей (Crump *et al.*, 2009).

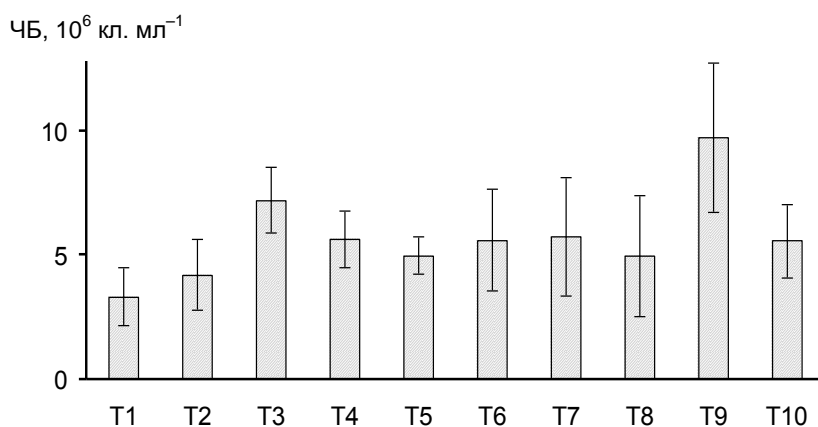


Рисунок 1 – Численность планктонных бактерий (ЧБ) в Енисее. Т1 – Т10 – номера трансект

Идентифицированные нами бактериальные ОТЕ (т.е. генетические эквиваленты видов бактерий)



принадлежали к 17 известным таксономическим группам, а также к 4 таксонам неопределённого положения. Кроме того, для 552 ОТЕ в базах данных не было обнаружено соответствующих репрезентативных последовательностей. Следовательно, выявленные ОТЕ, депонированные нами в базе данных The Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, номер доступа SRP036054), могут рассматриваться как новые штаммы (или генетические «виды»). Сравнительно большое число выявленных ОТЕ принадлежало к Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes и Verrucomicrobia.

На всех участках отбора проб по относительной численности доминировали Actinobacteria и Proteobacteria (Рис. 2). На трансектах 1 и 2 также были относительно многочисленными представители Firmicutes, а на трансектах с 3 по 5 - Bacteroidetes и Cyanobacteria.

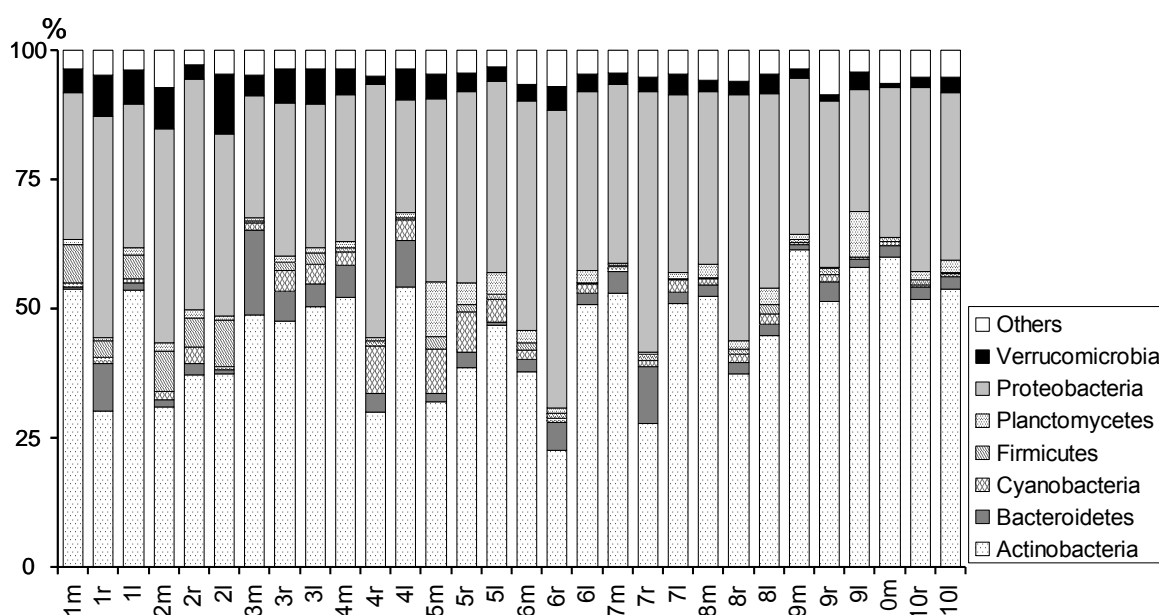


Рисунок 2 – Процентные соотношения наиболее многочисленных таксономических групп бактерий в р. Енисей, июнь 2012 г. Аббревиатуры мест отбора проб: число 1–10 – номер трансекты, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег

Что касается характеристики видового богатства бактериальных сообществ (альфа-разнообразия), то кривые разрежения (rarefaction curves) для проб со станций 2l (станция ниже Ангары, левый берег) и 4r (ниже Подкаменной Тунгуски, правый берег) возрастали медленнее, чем для проб с других станций (Рис. 3). Это означает, что на упомянутых выше станциях число видов бактерий было наименьшим, и их распределение по численности было наименее равномерным. С другой стороны, кривые разрежения для станций 6m и 6r (ниже Нижней Тунгуски, центр течения и правый берег) возрастали быстрее всех остальных (Рис. 3), то есть, на этих станциях было больше видов бактерий в

сообществах, и здесь отмечалось более равномерное распределение численности видов, чем на других станциях.

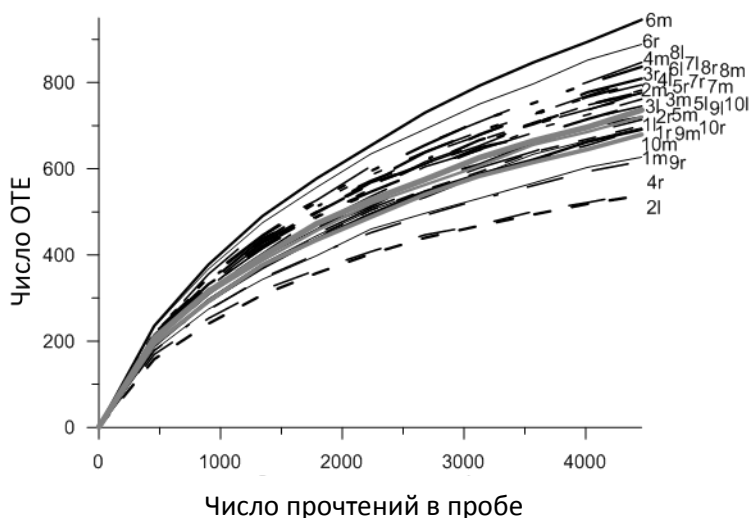


Рисунок 3 – Кривые разрежения (rarefaction curves) видового богатства (альфа-разнообразия) бактериопланктона р. Енисей. Аббревиатуры мест отбора проб: число 1–10 – номер трансекты, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег; ОТЕ – операционная таксономическая единица

Реки являются системами с однонаправленным потоком, где по мере продвижения от истока к устью накапливается всё больше биогенных веществ, вымываемых из окружающих почв (Besemer et al., 2013). В таком случае логичным выглядит предположение, что разнообразие бактерий также должно возрастать с движением вниз по течению реки (Besemer et al., 2013). Однако в р. Енисей не было обнаружено подобного монотонного возрастания альфа-разнообразия (разнообразия внутри сообщества) бактерий. Также в ходе работы было обнаружено, что самый высокий процент цианобактерий наблюдается в средней части р. Енисей. На многих трансектах Енисея существуют значительные различия экологических параметров между левым и правым берегами; в том числе, это касается и сообществ бактериопланктона. Эти различия были вызваны влиянием больших правых притоков, таких как р. Подкаменная Тунгуска, Нижняя Тунгуска и др. Согласно полученным величинам коэффициента подобия Брея–Кёртиса (общепринятой количественной меры бета-разнообразия, отражающей сходство видового состава сообществ), сходство между станциями отбора проб снижалось вниз по течению реки от трансекты 1 к трансекте 10. Результаты многомерного анализа степени сходства (MDS) между пробами бактериальных сообществ р. Енисей приведены на Рис. 4. В координатах двух первых осей с наибольшим значимым вкладом четко выделяются три кластера: пробы с трансект 1-2, трансект 3-5 и трансект 6-10 (Рис. 4).

Статистическая достоверность различий между этими кластерами подтверждена тестом ANOSIM (анализ сходства): выборочный показатель (глобальное значение)  $R = 0,583$ ,  $p = 0,001$ . Таким образом, по видовому составу бактериопланктона в р. Енисей выделяются три участка: участок I (трансекты 1-2), участок II (трансекты 3-5) и участок III (трансекты 6-10). Десять ОТЕ из

каждого участка с наивысшей средней относительной численностью (%) перечислены в таблице 2.

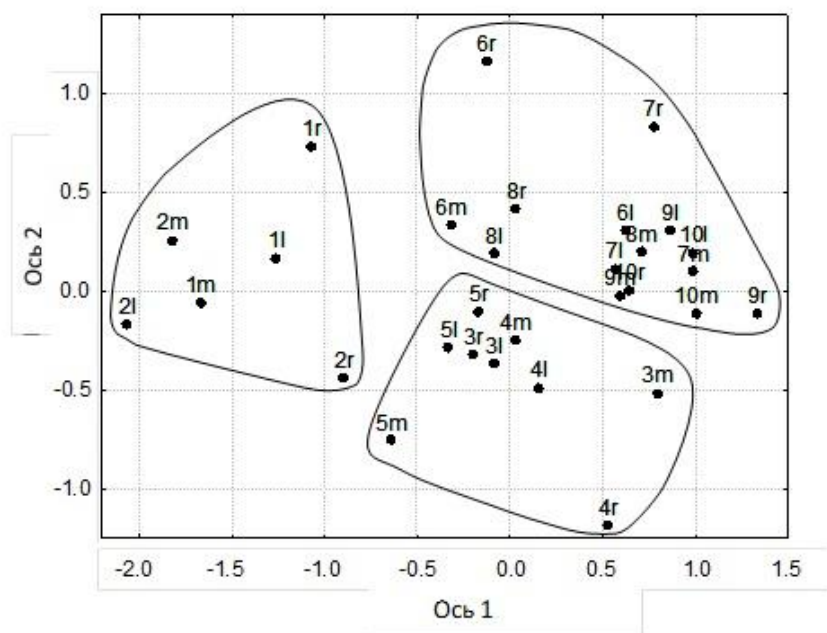


Рисунок 4 – Результаты многомерного анализа степени сходства (MDS) между пробами бактериальных сообществ р. Енисей, основанные на коэффициентах подобия Брея-Кёртиса, вычисленных по относительной численности операционных таксономических единиц (ОТЕ). Аббревиатуры мест отбора проб: число 1–10 – номер трансекты, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег

Доминантными индикаторными таксонами участка I, имевшими более высокую численность, чем на участках II и III, являлись ОТЕ 13 *Rhizobium*, ОТЕ 15 *Rhodobacter* и ОТЕ 25 *Arthrobacter*. Род *Rhizobium* – это бактерия корневых клубеньков растений (Castagno et al., 2011), и их высокая численность в речной воде «горного» участка I является неожиданной и трудно объяснимой. Для бактерий *Rhodobacter* в литературе отмечено увеличение численности в речных биоплёнках после добавления пестицидов (Tien et al., 2013). Для участка I как раз было характерно галечное дно, покрытое биоплёнками, и некоторое антропогенное загрязнение (Gladyshev et al., 2012). Бактерии *Arthrobacter*, по литературным данным, осуществляют в реках деградацию ароматических загрязняющих веществ (Narancic et al., 2012). Ранее именно на данном «горном» участке р. Енисей была обнаружена высокая активность фенол-деградирующих бактерий (Gladyshev et al., 1993).

Основной особенностью бактериального сообщества среднего участка реки Енисей (трансекты 3-5) была высокая относительная численность цианобактерий. Доминантной бактерией на этом участке был представитель *Cyanobacteria* ОТЕ 21 *GpIIa*.

Таблица 2 – Средние значения ( $\pm$  стандартные ошибки) относительной численности наиболее многочисленных (по десять из каждого участка) операционных таксономических единиц (ОТЕ) на трёх участках р. Енисей в июне 2012 г.: участок I (трансекты 1-2), участок II (трансекты 3-5) и участок III (трансекты 6-10). Dis – вклад (%) в средние различия между участками по данным многомерного статистического теста относительного сходства SIMPER. Средние значения, отмеченные одинаковой буквой, достоверно не различаются при  $p < 0.05$  по данным post-hoc теста Фишера наименьшего значимого различия (LSD) для однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. При недостоверном ANOVA буквенные обозначения отсутствуют

ОТЕ	Класс	Порядок	Семейство	Род	Участок I	Участок II	Участок III	Dis
1297	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	<i>Ilumatobacter</i>	5.80 $\pm$ 1.49	3.99 $\pm$ 0.59	4.57 $\pm$ 0.48	2.66
2	$\alpha$ -Proteobacteria	Rhizobiales			4.25 $\pm$ 1.18 <sup>A</sup>	3.87 $\pm$ 0.76 <sup>A</sup>	1.62 $\pm$ 0.32 <sup>B</sup>	2.51
2179	Actinobacteria	Actinomycetales			0.34 $\pm$ 0.16 <sup>A</sup>	2.69 $\pm$ 0.46 <sup>A</sup>	5.42 $\pm$ 0.73 <sup>B</sup>	1.98
18	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae		0.31 $\pm$ 0.18 <sup>A</sup>	1.95 $\pm$ 0.53 <sup>B</sup>	1.26 $\pm$ 0.27 <sup>A</sup>	1.88
13	$\alpha$ -Proteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	2.79 $\pm$ 1.09 <sup>A</sup>	0.67 $\pm$ 0.15 <sup>B</sup>	0.73 $\pm$ 0.20 <sup>B</sup>	1.64
8	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae		2.89 $\pm$ 0.68 <sup>A</sup>	0.65 $\pm$ 0.13 <sup>B</sup>	0.29 $\pm$ 0.08 <sup>B</sup>	1.47
10	$\beta$ -Proteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	<i>Limnohabitans</i>	1.01 $\pm$ 0.60	1.94 $\pm$ 0.58	1.96 $\pm$ 0.29	1.40
15	$\alpha$ -Proteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>	2.73 $\pm$ 0.21 <sup>A</sup>	0.90 $\pm$ 0.14 <sup>B</sup>	0.17 $\pm$ 0.04 <sup>C</sup>	1.20
25	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	1.91 $\pm$ 0.57 <sup>A</sup>	0.25 $\pm$ 0.04 <sup>B</sup>	0.34 $\pm$ 0.09 <sup>B</sup>	1.13
21	Цyanobacteria		Family II	<i>GpIIa</i>	0.41 $\pm$ 0.13 <sup>A</sup>	1.93 $\pm$ 0.46 <sup>B</sup>	0.32 $\pm$ 0.07 <sup>A</sup>	1.13
2588	Actinobacteria	Actinomycetales			0.69 $\pm$ 0.33 <sup>A</sup>	1.60 $\pm$ 0.37 <sup>A</sup>	2.23 $\pm$ 0.27 <sup>B</sup>	1.12
671	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	<i>Ilumatobacter</i>	0.18 $\pm$ 0.09 <sup>A</sup>	1.59 $\pm$ 0.32 <sup>B</sup>	2.32 $\pm$ 0.25 <sup>B</sup>	1.05
4	Actinobacteria	Actinomycetales			2.88 $\pm$ 0.52 <sup>A</sup>	1.83 $\pm$ 0.19 <sup>B</sup>	0.80 $\pm$ 0.12 <sup>C</sup>	1.02
6	$\alpha$ -Proteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	<i>Methylocystis</i>	1.71 $\pm$ 0.46	2.44 $\pm$ 0.31	1.61 $\pm$ 0.21	1.01
47	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae		2.08 $\pm$ 0.41 <sup>A</sup>	0.62 $\pm$ 0.08 <sup>B</sup>	0.36 $\pm$ 0.05 <sup>B</sup>	0.96
12	Actinobacteria				1.76 $\pm$ 0.52 <sup>A</sup>	0.90 $\pm$ 0.19 <sup>B</sup>	0.88 $\pm$ 0.11 <sup>B</sup>	0.94
11	$\beta$ -Proteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae		1.29 $\pm$ 0.09	2.27 $\pm$ 0.51	1.85 $\pm$ 0.24	0.94
16	$\alpha$ -Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae		1.79 $\pm$ 0.73 <sup>A</sup>	0.68 $\pm$ 0.13 <sup>B</sup>	0.33 $\pm$ 0.05 <sup>B</sup>	0.91
5	$\beta$ -Proteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Polynucleobacter</i>	1.76 $\pm$ 0.23 <sup>A</sup>	2.01 $\pm$ 0.51 <sup>A</sup>	3.53 $\pm$ 0.52 <sup>B</sup>	0.87
17	$\gamma$ -Proteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	0.10 $\pm$ 0.04 <sup>A</sup>	0.65 $\pm$ 0.36 <sup>A</sup>	2.19 $\pm$ 0.50 <sup>B</sup>	0.59

Доминантным индикаторным таксоном участка III была космополитная водная бактерия ОТЕ 5 *Polynucleobacter* (Ghai et al., 2011). Некоторые виды рода *Polynucleobacter* особенно многочисленны в водах с высоким содержанием аллохтонного растворённого органического вещества, включая гуминовые кислоты (Watanabe et al., 2012). Для нижнего течения р. Енисей как раз характерны высокие концентрации растворённого органического вещества, включая аллохтонные гуминовые вещества (Gladyshev et al., 1993). Другим индикаторным таксоном участка III была ОТЕ 17 *Acinetobacter*. Некоторые виды этого рода являются копиотрофными речными бактериями (Bhadra et al., 2007), что также согласуется с вышеупомянутым высоким содержанием органического вещества на участке III.

Итак, видовой состав и бета-разнообразие бактериальных сообществ в реке зависит от окружающего ландшафта (биома). На трех участках Енисея, расположенных в районе Енисейского кряжа, в Западно-Сибирской равнине с тайгой, а также в лесотундре и тундре в области вечной мерзлоты, соответственно, отмечены три разных бактериальных сообщества. Нижняя часть р. Енисей (трансекты 6-10) отделена от средней части крупным притоком р. Нижняя Тунгуска. Таким образом, один из возможных факторов формирования бактериального разнообразия реки – привносимые бактериальные сообщества притоков, протекающих через биомы разного типа.

#### **Глава 4. Экспериментальное изучение потребления аминокислот бактериопланктоном эвтрофного водохранилища**

В контрольной МЭС эксперимента I, проводившегося с 30 июня по 6 июля 2004 г. (Рис. 5), в течение всего эксперимента не происходило существенных качественных и количественных изменений состава бактериопланктона по сравнению с исходной пробой. В МЭС с добавкой глицина произошло увеличение относительной плотности двух исходно заметных полос (*Gly1*, *Gly3*) (слово «полоса» является прямым переводом термина «band», общепринятого в англоязычной литературе по молекулярной экологии микроорганизмов при обсуждении молекулярных фингерпринтов сообществ, и условно соответствует генетическому «виду» бактерии) с последующим исчезновением одной из них к концу эксперимента (*Gly1*) и проявление трех не обнаруживаемых в исходной пробе полос (*Gly2*, *Gly4*, *Gly5*). В МЭС с добавкой лизина на вторые сутки эксперимента одно из доминирующих положений заняла полоса *Lys1*, однако к концу эксперимента её доля (относительная плотность) уменьшилась (Рис. 5). К

четвертым суткам в доминанты вышла полоса *Lys2*, но впоследствии она также уступила доминантную позицию двум новым полосам.

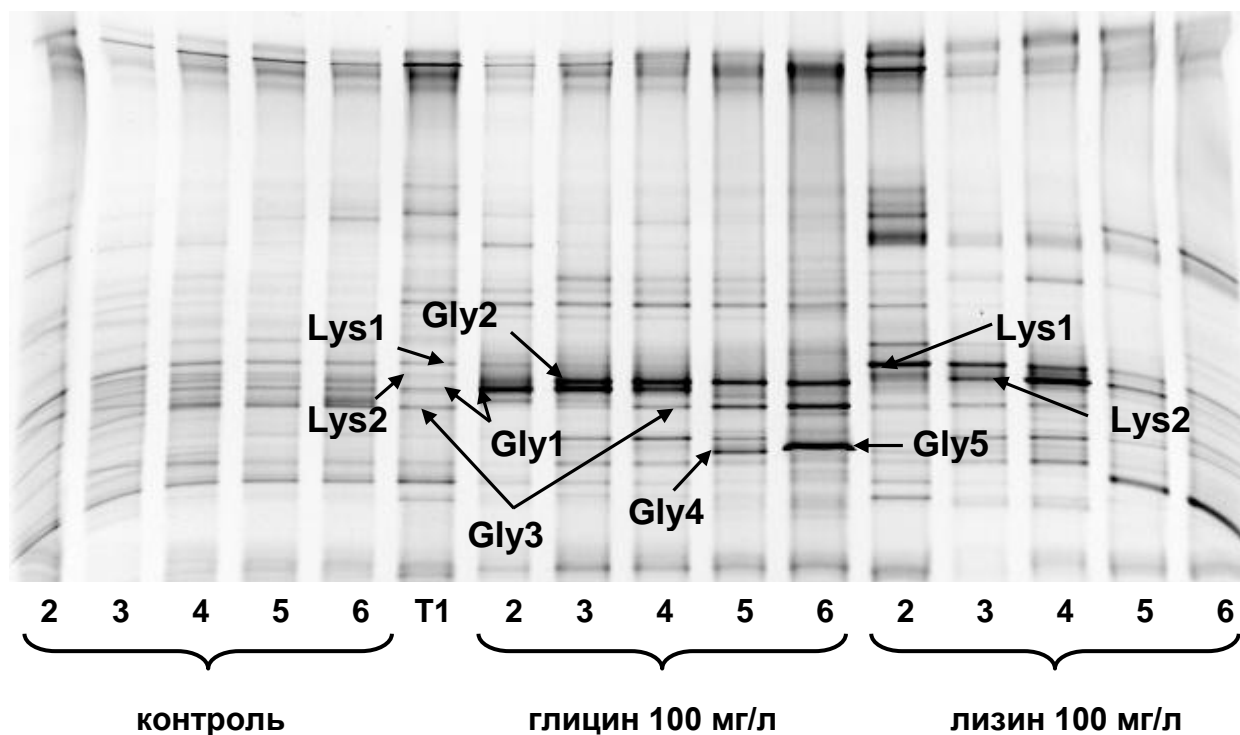


Рисунок 5 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона I эксперимента из МЭС с добавками лизина, МЭС с добавкой глицина, контрольной МЭС и исходной пробы (Т1). Стрелки указывают на полосы ДНК, нуклеотидная последовательность которых определена (кроме *Gly3*)

По результатам филогенетического анализа установлено, что бактерии, соответствующие полосам *Lys1* и *Lys2*, доминировавшим в течение первых трех суток в МЭС с добавкой лизина, принадлежали к семейству Burkholderiaceae класса Betaproteobacteria (Рис. 6). Полоса *Gly1* имела 100% идентичность анализируемого участка гена 16S рНК с некультивируемой бактерией, наиболее близкой к *Chloroflexi*. Ближайшие родственники бактерий, соответствующих полосам *Gly2*, *Gly4* и *Gly5* из МЭС с добавкой глицина, принадлежали к семейству Comamonadaceae класса Betaproteobacteria. Таким образом, отдельные виды некультивируемого свободноживущего бактериопланктона оказались узкоспециализированными по способности к потреблению некоторых аминокислот.

В экспериментах II (17 – 23 августа 2005 г.), III (17 – 23 мая 2006 г.) и V (14 – 20 мая 2013 г.) не произошло значительных изменений в составе бактериального сообщества после добавления аминокислот. Одной из возможных причин отмеченных различий могут быть функциональные особенности весеннего и осеннего (позднелетнего) бактериопланктона водохранилища. Согласно

полученным данным, весной и поздним летом бактерии, специализирующиеся на потреблении лизина, в сообществе были функционально неактивны. Возможно, их активность была подавлена пониженной температурой воды или иными неблагоприятными экологическими факторами.

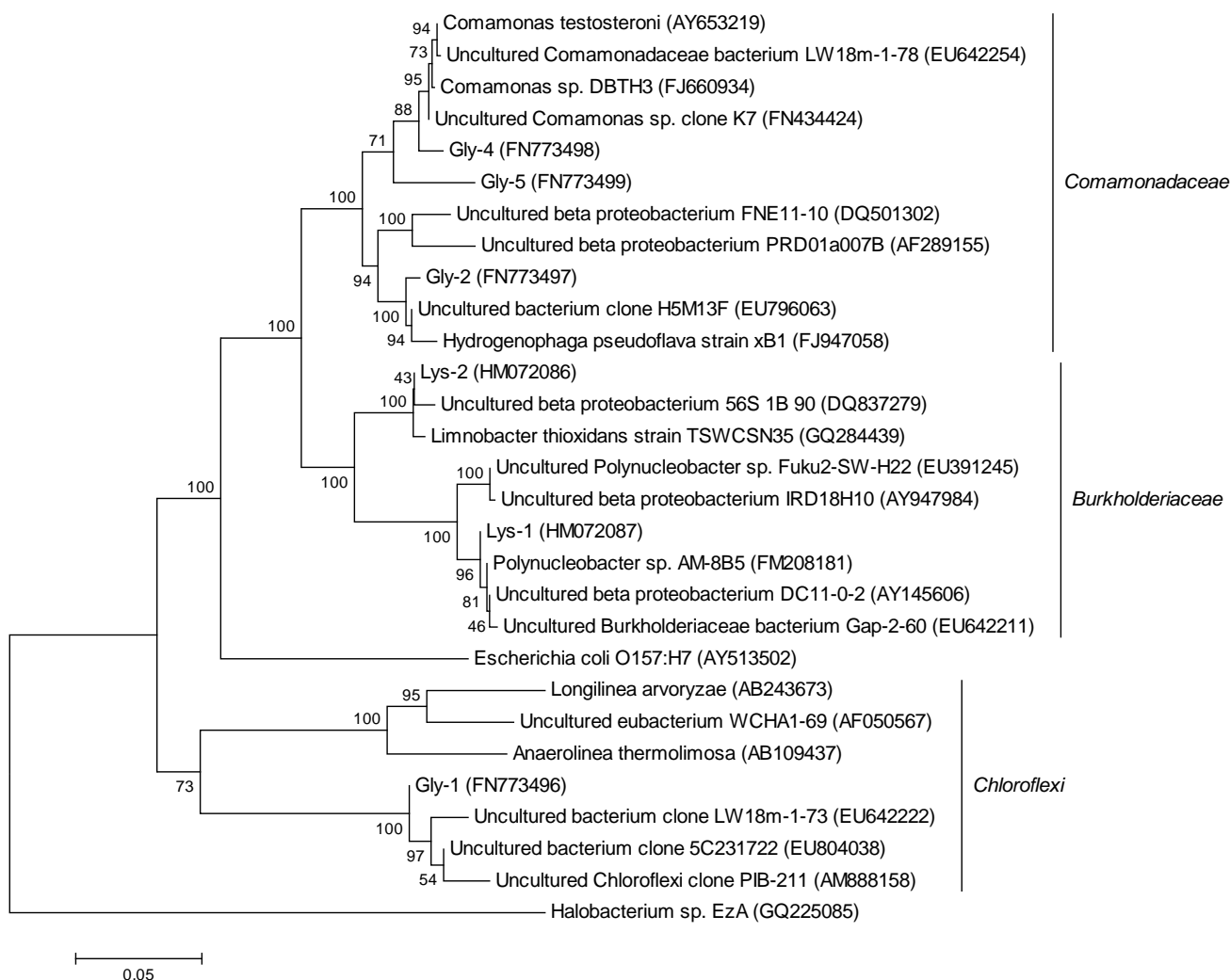


Рисунок 6 – Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, соответствующих полосам ДГГЭ из экспериментов с микроэкосистемами. Выборочные последовательности из базы данных GenBank и референсные штаммы включены для сравнения. В скобках указаны номера последовательностей в GenBank.

В эксперименте IV (31 июля – 5 августа 2009 г.) после добавления лизина в МЭС в доминанты выходят те же виды *Lys1* и *Lys2*, что и в I эксперименте (30 июня – 6 июля 2004 г.) (Рис. 7). То есть, отклик летнего сообщества бактериопланктона на добавку лизина был устойчивым и повторялся в разные годы. В динамике бактериопланктонного сообщества в эксперименте IV можно заметить некоторые закономерности (Рис. 7). Вид *Lys1* доминировал во всех МЭС вне зависимости от концентрации лизина. В ходе эксперимента доли видов, доминировавших в исходной пробе (*IVa*, *IVb*) уменьшались, и тем скорее, чем



больше была концентрация аминокислоты в МЭС. Доли других видов (*IVf*, *IVh*) увеличивались в ходе эксперимента, и тем быстрее, чем больше была концентрация лизина. Отдельные виды доминировали только в МЭС с наибольшей [\*] (*IVf*, *IVh*, *IVi*, *IVg*) или наименьшей (*IVe*, *IVd*, *IVj*) концентрацией лизина. Таким образом, виды бактериопланктона реагируют по-разному на добавление различных концентраций одной и той же аминокислоты.

На рисунке 8 изображено филогенетическое древо, содержащее все полосы IV эксперимента, для которых была определена нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК, а также полосы Lys1 и Lys2 из эксперимента I. Выявлено 3 отдельных кластера: Proteobacteria, группа FCB (Flavobacterium-Chlorobi-Bacteriodetes), Actinobacteria.

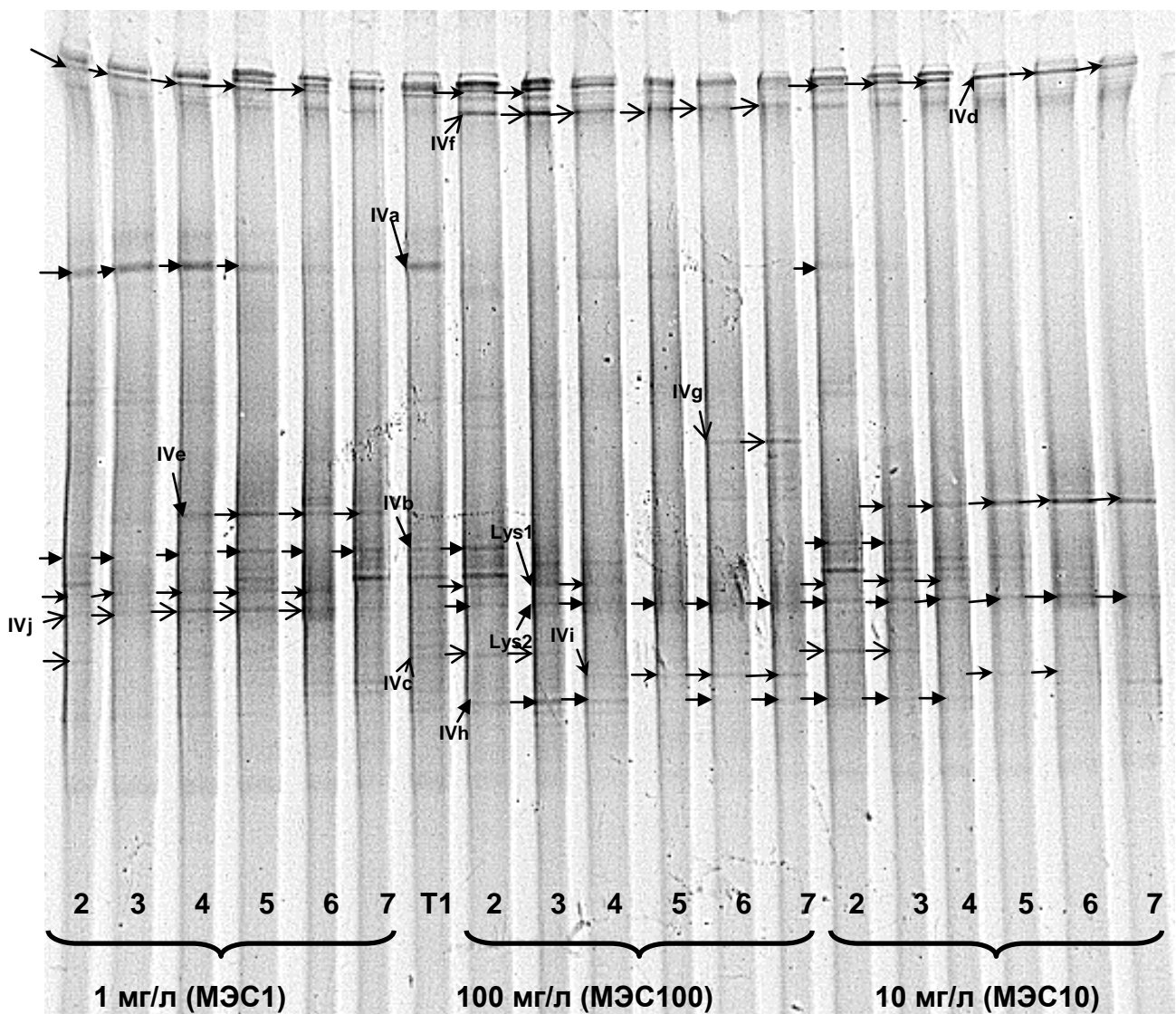


Рисунок 7 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из МЭС и исходной пробы (Т1) эксперимента IV. Номер дорожки соответствует суткам эксперимента.

Стрелками отмечены доминирующие виды



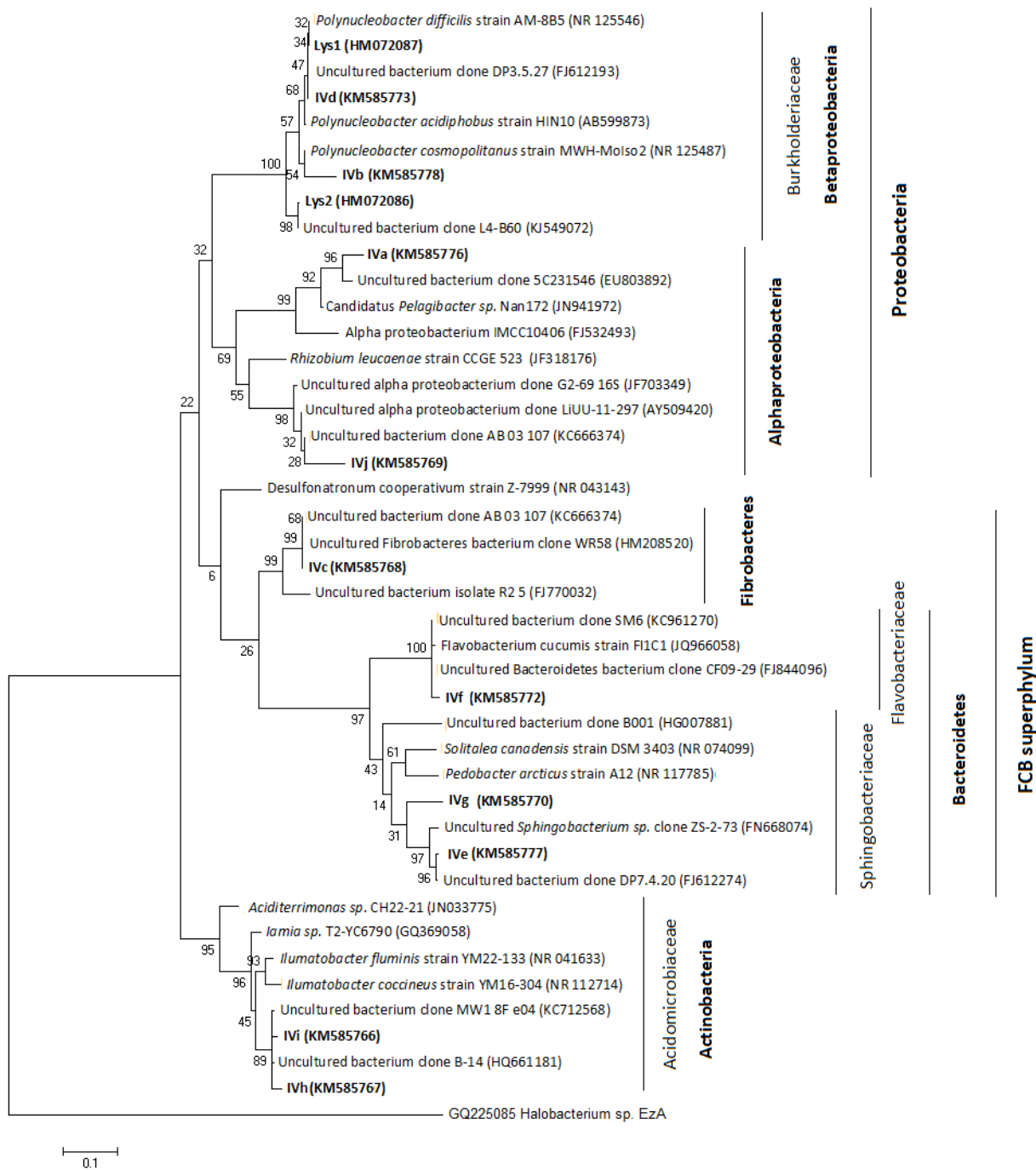


Рисунок 8 – Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, соответствующих полосам ДГГЭ из микрэкосистем с добавками лизина в экспериментах I и IV. В скобках указаны номера последовательностей в GenBank

Таким образом, обнаруженная узкая специализация видов бактериопланктона к потреблению определенных органических веществ, а также низкая активность в сообществе специализированных видов в некоторые сезоны имеют существенное значение для понимания процессов самоочищения экосистемы водоема от органических загрязнений. Если в некоторые периоды времени в водоёме становятся неактивными виды, способные утилизировать

загрязняющее вещество, то экосистема в такие периоды становится особо уязвимой к антропогенному загрязнению.

### **Итоги, рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы**

Знания о конкретных видах бактериопланктона и потребляемых ими субстратах в настоящее время могут быть формализованы в математических моделях водных экосистем, предназначенных для прогноза и управления качеством природных вод. В эколого-математических моделях управления качеством природных вод функциональная (биогеохимическая) роль видов в экосистеме формализуется в виде численных значений кинетических ростовых характеристик, которые количественно выражают интегральную скорость биохимических реакций, заложенных в генотипе организмов (Дегерменджи и Гладышев, 1995; Гладышев, 1999). Продолжением исследований, проведённых в этой работе, может стать определение кинетических характеристик различных видов водных бактерий. В настоящее время во многих моделях, прогнозирующих изменение качества природных вод, гетеротрофный бактериопланктон описывается как агрегированная компонента, что не позволяет адекватно отображать функциональную роль доминирующих видов бактерий (Degermendzhi, 2010). Точность прогноза и успешность управления состоянием водных экосистем, несомненно, повысятся в случае замены в моделях агрегированного бактериопланктона и агрегированного «органического вещества» на сведения о конкретных видах бактерий при использовании точных экспериментальных данных об утилизируемых этими бактериями органических веществах.

### **ВЫВОДЫ**

1) В составе бактериопланктона р. Енисей обнаружено 3022 операционных таксономических единицы («генетических видов»). Альфа-разнообразие сообществ бактериопланктона и относительная доля цианобактерий достигают максимальных значений в среднем течении реки.

2) В бактериопланктоне р. Енисей выявлены три комплекса (сообщества), достоверно отличающиеся по видовому составу и структуре, которые формируются, в частности, в результате биогеохимического влияния окружающего ландшафта (биома): горной тайги (верхний участок реки), равнинной тайги (средний участок) и лесотундры и тундры (нижний участок). Доминирующие таксоны каждого из комплексов специализируются в потреблении разных групп органических веществ.

3) С использованием нестерильного культивирования в экспериментальных микроэкосистемах выявлены виды летнего

бактериопланктона модельного водохранилища Бугач, питающиеся лизином и глицином. Полученные данные свидетельствуют о том, что исследованные виды свободноживущих бактерий специализированы к потреблению узкого спектра аминокислот.

4) Отклик летнего сообщества бактериопланктона водохранилища Бугач на добавку лизина устойчив и повторяется в разные годы. В отличие от летних экспериментов, добавление лизина в весеннее и позднелетнее пелагическое сообщество водохранилища не вызвало значительных изменений количественного и качественного состава бактериопланктона. Полученные данные свидетельствуют о том, что способность водных экосистем к самоочищению от отдельных органических веществ может существенно меняться в течение вегетационного сезона.

#### **ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ** (журналы из списка ВАК)

1. Колмакова, О. В. Потребление аминокислот некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища / О. В. Колмакова, М. Ю. Трусова // Сибирский экологический журнал. – 2011. – № 1. – С. 13–21. (Contemporary Problems of Ecology. – 2011. – V. 4, № 1. – P. 8-14)

2. Трусова, М. Ю. Сезонные особенности потребления лизина некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища / М. Ю. Трусова, О. В. Колмакова, М. И. Гладышев // Сибирский экологический журнал. – 2012. – № 4. – С. 529–539. (Contemporary Problems of Ecology. – 2012. – V. 5, № 4. – P. 391-398)

3. Колмакова, О. В. Современные методы определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона / О. В. Колмакова // Журнал Сибирского федерального университета. – 2013. – Т. 6. – №1. – С. 73–95.

4. Толмеев, А. П. Составные элементы круговорота углерода в экосистеме среднего и нижнего Енисея / А. П. Толмеев, О. В. Анищенко, Е. С. Кравчук, Л. А. Глущенко, О. Н. Махутова, А. А. Колмакова, В. И. Колмаков, М. Ю. Трусова, Н. Н. Сущик, М. И. Гладышев // Сибирский экологический журнал. – 2014. – №4. – С. 647–661. (Contemporary Problems of Ecology. – 2014. – V. 7, № 4. – P. 489-500)

5. Kolmakova, O.V. Spatial biodiversity of bacteria along the largest Arctic river determined by next-generation sequencing / O.V. Kolmakova, M. I. Gladyshev, A. S. Rozanov, S. E. Peltek, M. Yu. Trusova // FEMS Microbiology Ecology. – 2014. – V. 89. – №. 2. – P. 442-450.