

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



Колмакова Олеся Владимировна

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

Специальность 03.02.10 – гидробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель –  
доктор биологических наук, профессор  
Гладышев Михаил Иванович

Красноярск – 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	5
Глава 1 Секвенирование следующего поколения и современные методы определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона .....	11
1.1 Секвенирование следующего поколения.....	11
1.2 Методы определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона .....	13
1.2.1 Анализ функциональных генов, транскриптов и белков .....	13
1.2.1.1 Методы «-омика» .....	13
1.2.1.1.1 Метагеномика.....	14
1.2.1.1.2 Метатранскриптомика.....	16
1.2.1.1.3 Метапротеомика.....	17
1.2.1.1.4 Метаболомика .....	18
1.2.1.2 Амплификация геномов единичных клеток.....	19
1.2.2 Методы с добавками питательных веществ.....	19
1.2.2.1 Мечение стабильными изотопами .....	21
1.2.2.1.1 Анализ липидов.....	21
1.2.2.1.2 Анализ ДНК.....	22
1.2.2.1.3 Анализ РНК .....	23
1.2.2.2 Применение бромдезоксисуридина и йоднитротетразолия фиолетового для определения биогеохимических функций бактериопланктона .....	25
1.2.2.3 Методы, основанные на флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	26
1.2.2.3.1 Комбинация микроавторадиографии с флуоресцентной гибридизацией <i>in situ</i> .....	28
1.2.2.3.2 Комбинация спектроскопии комбинационного рассеяния света, изотопных меток и флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i> .....	29
1.2.2.3.3 Мультиизотопная визуализирующая масс-спектрометрия .....	31

1.2.2.3.4 Комбинация бета-микроимиджинга с флуоресцентной гибридизацией <i>in situ</i> .....	32
1.2.2.4 Изотопные чипы.....	33
1.2.2.5 Метод фингерпринтов («отпечатков пальцев»).....	34
1.3 Сравнение методов и выбор наиболее оптимального пути для решения поставленных задач.....	36
Глава 2 Материал и методы исследований.....	39
2.1 Река Енисей.....	39
2.2 Водоохранилище Бугач .....	42
2.3 Методы исследования.....	42
2.3.1 Отбор проб бактериопланктона Енисея .....	42
2.3.2 Постановка экспериментов в МЭС .....	44
2.3.3 Отбор проб в ходе экспериментов .....	46
2.3.4 Выделение геномной ДНК.....	47
2.3.4.1 Бактериопланктон Енисея.....	47
2.3.4.2 Бактериопланктон МЭС .....	47
2.3.5 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК.....	48
2.3.5.1 Бактериопланктон Енисея.....	48
2.3.5.2 Бактериопланктон МЭС .....	49
2.3.6 Получение библиотеки ампликонов участка гена 16S рРНК.....	50
2.3.7 Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК бактериопланктона Енисея методом секвенирования следующего поколения (NGS) .....	50
2.3.8 Биоинформатический анализ данных NGS .....	51
2.3.9 Определение численности бактериопланктона .....	52
2.3.10 Анализ изменений в составе бактериопланктона в МЭС методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза.....	53
2.3.11 Клонирование генов 16S рРНК бактериопланктона из экспериментов в МЭС .....	54
2.3.11.1 I эксперимент.....	54

2.3.11.2 IV эксперимент.....	55
2.3.12 Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК бактериопланктона из экспериментов в МЭС.....	56
2.3.12.1 I эксперимент.....	56
2.3.12.2 IV эксперимент.....	57
2.3.13 Филогенетический анализ.....	57
Глава 3 Биоразнообразие и численность бактериопланктона р. Енисей.....	58
3.1 Численность.....	58
3.2 Альфа-разнообразие.....	58
3.3 Бета-разнообразие.....	64
3.4 Сравнение с другими реками.....	71
Резюме.....	72
Глава 4 Экспериментальное изучение потребления аминокислот бактериопланктоном эвтрофного водохранилища.....	74
4.1 Июль 2004 (I эксперимент).....	74
4.2 Август 2005 (II эксперимент).....	83
4.3 Май 2006 (III эксперимент).....	84
4.4 Август 2009 (IV эксперимент).....	86
4.5 Май 2013 (V эксперимент).....	93
Обсуждение.....	93
Резюме.....	96
Заключение.....	97
Выводы.....	100
Список литературы.....	101

## ВВЕДЕНИЕ

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 (Вернадский, 1978). 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, например, крупные нитчатые бактерии и цианобактерии (Заварзин, 2003). Метод культивирования тоже имеет значительные ограничения, поскольку на средах вырастает не более 1% водных бактерий, определяемых прямым счетом (Горленко и др., 1977; Cole, 1982; Amann et al., 1995). Чем ниже уровень трофности водоёма, тем больше разрыв между результатами подсчёта численности водных бактерий методами микроскопии и культивирования, который может достигать десятков тысяч раз для олиготрофных водоёмов (Заварзин, 2003). Многие виды бактериопланктона невозможно культивировать на лабораторных средах (Cases, de Lorenzo, 2002). 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 видоспецифич-

ные функции каждого вида в экосистеме. В связи с проблематичностью идентификации отдельных видов первоначально выделялись целые группы бактерий, предположительно объединённые общей биогеохимической функцией (Ouverney, Fuhrman, 1999). Подробно изучалось участие агрегированных групп водных микроорганизмов в процессах фотосинтеза, хемосинтеза и деструкции органических веществ (углеводов, белков, аминокислот, аминсахаров, альгиновых кислот, углеводовородов, гуминовых веществ и др.) в круговороте азота и других элементов (Горленко и др., 1977; Weiss, Simon, 1999; Grover, Chrzanowski, 2000; Rosenstock, Simon, 2001; Perez et al., 2003; Zubkov et al., 2008). Однако роль отдельных видов в деструкции органических веществ долго оставалась неизвестной в связи с трудностями видовой идентификации бактериопланктона. В то же время многие авторы указывали на необходимость определения филогенетической принадлежности бактериопланктона, участвующего в тех или иных биогеохимических процессах (Grover, Chrzanowski, 2000; Perez et al., 2003). Эти ограничения были преодолены с появлением в последние два десятилетия молекулярно-генетических методов определения видовой принадлежности бактерий.

Молекулярно-генетические методы, такие как анализ последовательности гена 16S рибосомальной РНК, мультилокусное типирование последовательностей (MLST) и анализ вариабельных по числу мультилокусных тандемных повторов (MLVA), широко используются для идентификации некультивируемого бактериопланктона (Hofle et al., 2008). В базах данных накапливается большое число последовательностей генов, принадлежащих водным бактериям, о которых помимо их места обитания и филогенетической принадлежности ничего не известно (Заварзин, 2003). Исследование физиологии бактериопланктона, и тем более его биогеохимической функции в природном водоёме – сложная задача. Многие виды бактерий являются некультивируемыми, поэтому невозможно исследовать потребляемые ими субстраты и выделяемые продукты в лабораторной культуре.

Бактерии не удаётся культивировать по нескольким причинам: 1) клетки вступили в некультивируемую стадию (Nyström, 2001); либо 2) бактериопланктон

представлен неизвестными видами, для которых еще не подобраны условия культивирования (Amann et al., 1995; Suzuki et al., 1997). Таким образом, некультивируемые виды бактериопланктона корректнее было бы назвать «пока ещё не культивируемыми» (Yokokawa, Nagata, 2010). По некоторым данным, часть видов бактерий невозможно выделить в чистую культуру, поскольку в природе они существуют только в тесном сообществе с другими организмами (Connon, Giovannoni, 2002). В любом случае, по мнению В. И. Вернадского, разделение «живых веществ» на чистые виды неизбежно упрощает реальные явления и противоречит естественному состоянию вещей, в то время как основное значение имеет так называемый "сложный вид", представляющий собой симбиоз видов – геохимическую органическую смесь (Вернадский, 1978). Даже если удастся выяснить, что изолированный и идентифицированный вид бактериопланктона в лабораторных условиях потребляет конкретное вещество, это не означает, что в природном сообществе водоёма, из которого он был выделен, данный вид выполняет ту же функцию. На одно и то же изменение внешней среды, например, увеличение концентрации питательного вещества, вид может реагировать по-разному, в зависимости от того, есть ли вокруг него другие биологические виды, и того, какие это виды (Lawrence et al., 2012). Исследуемый вид может начать утилизировать предложенное вещество ввиду недоступности иных субстратов, потребляемых им в естественных условиях. Или вполне вероятно, что в естественных условиях конкуренты потребляют данное вещество более успешно, чем исследуемый вид, и ему приходится довольствоваться другими ресурсами. Таким образом, если в лабораторных условиях не моделируются такие природные факторы, как гетерогенность среды, конкуренция за ресурсы, хищничество и другие взаимодействия, то культивирование изолированного вида не позволяет определить особенности физиологии и жизнедеятельности данных микроорганизмов в природных экосистемах (Maron et al., 2007).

В настоящее время микробиологические исследования проводятся с использованием двух групп методов. Во-первых, применяются классические методы культивирования. Исторически неизменным условием идентификации бактерий является их выделение в чистые культуры по физиолого-биохимическим признакам (Определитель бактерий Берджи, 1997). Во-вторых, всё чаще используются молекулярно-генетические методы, благодаря которым в геометрической прогрессии увеличивается объём данных о последовательностях бактериальных генов и разнообразии природных бактериальных сообществ на основе выделения операционных таксономических единиц (Hofle et al., 2008). Наблюдается парадокс: первоначально таксономическая идентификация бактерий основывалась на их биогеохимической функции – культивировании на селективных средах, а те, что культивировать и идентифицировать не удавалось, оставались без внимания исследователей. В настоящее же время легко идентифицировать бактерию методами молекулярной генетики, но трудно определить её функцию. Знания о функции популяций и сообществ бактериопланктона необходимы для прогнозирования их отклика на меняющиеся условия окружающей среды и понимания биогеохимических процессов, происходящих в экосистеме (Zehr, 2010). Таким образом, необходимы адекватные методы, позволяющие определять видоспецифичные экологические (биогеохимические) функции в водных экосистемах некультивируемых бактерий, идентифицируемых средствами молекулярной генетики.

Перспективным методом для изучения потребления различных веществ отдельными видами бактериопланктона является метод экспериментальных микроэкосистем (МЭС), содержащих пробы природного сообщества бактериопланктона, в которые добавляются тестируемые питательные вещества. Ранее было установлено, что в МЭС в течение недели сохраняется и функционирует естественное планктонное сообщество (Гладышев, 1999). Для мониторинга изменений состава доминирующих видов внутри бактериальных сообществ в МЭС часто используется метод разделения амплифицированных фрагментов гена 16S рибосомальной



РНК с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза (ДГГЭ) (Martin et al., 2012).

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.

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 видового состава бактериопланктона на добавление различных аминокислот.

При решении поставленных задач были получены результаты, которые выносятся на защиту:

1) В р. Енисей выделяются три сообщества бактериопланктона, достоверно отличающиеся по видовому составу, и населяющие участки реки, расположенные в горной тайге, равниной 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 отдельных органических веществ.

Апробация работы: материалы диссертации докладывались на V Международной конференции по промышленной, прикладной микробиологии и микробиологии окружающей среды - BioMicroWorld2013 (Мадрид, Испания, 2013); XV Школе-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).

# ГЛАВА 1 СЕКВЕНИРОВАНИЕ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ И СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИДОСПЕЦИФИЧНЫХ БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

## 1.1 Секвенирование следующего поколения

Существует множество молекулярно-генетических методов идентификации видового состава естественных микробных сообществ (Трусова, 2004). В основе молекулярной систематики бактерий лежит последовательность нуклеотидов гена 16S рибосомальной РНК, различия в которой служат мерой эволюционного расстояния между организмами. Для установления последовательности нуклеотидов в генах используются различные технологии секвенирования. Классический метод секвенирования – метод обрыва цепи, также известный как секвенирование по Сэнгеру. Он основан на селективном включении ДНК-полимеразой дидеоксинуклеотидов, обрывающих цепь синтеза во время репликации ДНК *in vitro*. Далее фрагменты ДНК разделяются по длине электрофорезом на пластине геля или в капилляре, и детектируется место включения соответствующего дидеоксинуклеотида.

Секвенирование по Сэнгеру предназначено для отдельных чистых образцов одного фрагмента ДНК длиной до 1000 пар оснований, поэтому требует предварительного разделения амплифицированных фрагментов генов различных членов природного сообщества методами молекулярного фингерпринтинга и клонирования. Но при всех приложенных усилиях число организмов в природных пробах многократно превышает возможности сэнгеровского секвенирования (Shokralla et al., 2012).

Самым высокопроизводительным на сегодняшний день является метод определения нуклеотидной последовательности гипервариабельных участков генов 16S рРНК с помощью секвенирования следующего поколения (NGS – «next-

generation sequencing) (Barriuso et al., 2011). Особенностью метода секвенирования следующего поколения является возможность параллельного определения массива нуклеотидных последовательностей ДНК с различных матриц, что исключает необходимость длительного и трудоёмкого разделения содержащегося в пробе генетического материала разных организмов. Полученные последовательности сравнивают с постоянно пополняющейся базой данных известных организмов (Engel et al., 2013). Современные вычислительные технологии позволяют делать выводы о мерах биоразнообразия во времени и пространстве путём кластеризации последовательностей ДНК филогенетическими методами. Лавинообразное увеличение числа публикаций с применением секвенирования следующего поколения свидетельствует о смене парадигмы в экологических исследованиях в сторону использования больших массивов данных о нуклеотидных последовательностях (Shokralla et al., 2012).

Существует несколько технологий секвенирования следующего поколения, применяемых в секвенирующих платформах различных производителей: 454 пиросеквенирование (Roche), секвенирование синтезом (Illumina), ионный полупроводник (Ion Torrent), секвенирование на основе лигирования (SOLiD) и другие (Mardis, 2008; Shokralla et al., 2012). В наиболее известной технологии – пиросеквенировании – применяется эмульсионная ПЦР, когда единичные молекулы ДНК, которые присоединены к бусинам, покрытым праймерами, амплифицируются в водяных каплях в растворе масла. Секвенирование происходит с пластинок со множеством ячеек, и в каждой ячейке находится по одной бусине. При присоединении нуклеотидов к цепи ДНК происходит вспышка света, детектируемая лазером (Shokralla et al., 2012).

На этапе, предваряющем секвенирование, в большинстве случаев проводят амплификацию фрагментов ДНК с праймерами, содержащими специфичный для данной технологии адаптер и уникальный баркод. Баркод позволяет разделять последовательности, относящиеся к различным пробам, в ходе последующего биоинформатического анализа. Также в ходе биоинформатического анализа с помо-

щью конвейера алгоритмов проводится отбраковка некачественных, малочисленных и химерных последовательностей, объединение схожих последовательностей в кластеры (операционные таксономические единицы - ОТЕ) и их идентификация путём сравнения с эталонными последовательностями в базах данных, например, Greengenes database (DeSantis et al., 2006; McDonald et al., 2012). Далее на основе полученных данных о встречаемости и численности операционных таксономических единиц можно вычислять индексы альфа- и бета-разнообразия сообществ, проводить статистический анализ и т.д. Количество единиц информации (пар оснований), получаемых за один цикл работы секвенаторов следующего поколения, на несколько порядков превышает возможности приборов, основанных на методе Сэнгера.

## 1.2 Методы определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона

### 1.2.1 Анализ функциональных генов, транскриптов и белков

Данная группа методов изучает состав функциональных генов и продуктов экспрессии генов бактериопланктонного сообщества, то есть, направлена на выявление потенциальной способности исследуемого бактериопланктона выполнять те или иные биогеохимические функции.

#### 1.2.1.1 Методы «-омика»

Ряд методов – анализ метагенома, метатранскриптома, метапротеома и метаболома – объединяется в англоязычной литературе неологизмом «омика» на основании общей части названий. Важное отличие методов «омика» от всех остальных методов определения биогеохимических функций бактериопланктона состоит в том, что они дают представление одновременно обо всех метаболических

процессах, которые потенциально могут происходить в сообществе (Maron et al., 2007).

#### 1.2.1.1.1 Метагеномика

Ко второму десятилетию XXI века приобрёл большую популярность молекулярный метод, потенциально позволяющий выявить биогеохимические функции бактериопланктонных сообществ – метагеномный анализ. Метагеномика изучает генетический материал всех членов целого сообщества (Logue et al., 2008).

Схема метагеномного анализа в последнее время была модернизирована: раньше ДНК выделялась из природной пробы воды, и создавалась библиотека векторов с последующим физиологическим или генетическим скринингом и определением нуклеотидной последовательности (Nardini et al., 2010). Методы секвенирования нового поколения позволили исключить затратный по времени и приложенным усилиям процесс создания библиотеки клонов (Schuster, 2008). Поскольку результат секвенирования метагенома представляет собой множество разрозненных нуклеотидных последовательностей, принадлежащих разным членам сообщества, на заключительном этапе осуществляется их сборка в имеющие смысл последовательности генов. Однако, ни один из «омика»-методов не способен установить, какой конкретно вид потребляет то или иное вещество. «Омика»-методы определяют лишь потенциальные свойства и функции целого сообщества.

Метагеномный анализ активно применяется для выявления потенциальных функций некультивируемого бактериопланктона в экосистеме. Например, в пробах бактериопланктона с поверхности океана были найдены гены, ответственные за потребление монооксида углерода и восстановленной серы (Hofle et al., 2008). Впоследствии было обнаружено, что соответствующие биогеохимические функции действительно были свойственны исследованному сообществу бактериопланктона. Однако в некоторых случаях наблюдаемый состав метагенома противоречит основной метаболической специализации бактериопланктонного сообще-

ства (Mou et al., 2008). Например, присутствие генов протеородопсина в морских планктонных бактериях должно свидетельствовать о том, что клетки способны использовать протеородопсин для получения энергии, то есть, они должны расти быстрее на свету, чем в темноте. Однако разные таксоны, содержащие ген протеородопсина, по-разному откликнулись на свет или его отсутствие, и большинство из них не увеличивали скорость роста на свету (Fuhrman and Steele, 2008). Наличие гена в популяции в составе бактериального сообщества не означает, что он экспрессируется в конкретных внешних условиях (Maron et al., 2007). Таким образом, основываясь на данных одних только метагеномных исследований, нельзя делать выводы, что микробное сообщество действительно выполняет в водной экосистеме функцию, соответствующую обнаруженным генам.

Для метагеномного анализа особенно важна репрезентативность пробоотбора. Обычно водные пробы фильтруют через планктонные сита для удаления крупных частиц и организмов, в особенности эукариот, которые могут мешать процессу обработки проб с помощью метагеномных методов, разработанных для прокариот (Grossart, 2010). Таким образом, удаляются макроагрегаты сестона и живые организмы, несущие на своей поверхности много бактерий. Многие бактерии, даже свободноживущие, проводят большую часть времени, концентрируясь в питательных зонах, окружающих частички сестона и живые организмы. То есть традиционные методы отбора проб бактериопланктона, применяемые в том числе и для метагеномного анализа, не учитывают различия в образе жизни бактерий и часто упускают «горячие точки» сосредоточения микробной активности и взаимодействия между микроорганизмами (Grossart, 2010). Существуют и другие методические сложности и «подводные камни» метагеномного анализа (Hofle et al., 2008), например, трудность сборки последовательностей генов из небольших секвенированных фрагментов, приводящая к пополнению баз данных генов несуществующими химерными и искусственными последовательностями (Kunin et al., 2008).

Метагеномика представляет собой надёжный инструмент для поиска новых генов. Однако, из информации о функциях бактериопланктонного сообщества, полученной на основании метагеномных данных, невозможно выделить информацию о видоспецифичных функциях отдельных популяций. Существуют и другие ограничения метагеномного подхода: 1) не всегда удаётся достичь достаточного перекрытия последовательностей для сборки генов всех организмов, особенно тех, чья доля в сообществе невелика; 2) невозможно функционально охарактеризовать гены, которые кодируют белки с неизвестными функциями (Heidelberg et al., 2010).

#### 1.2.1.1.2 Метатранскриптомика

Основной недостаток описанного выше метагеномного анализа заключается в том, что наличие гена не свидетельствует о его экспрессии. Другой метод «омика» – метатранскриптомика – выгодно отличается от метагеномики тем, что исследует не генный состав сообщества, а его транскрипты: матричную РНК. Наличие генных транскриптов в клетках бактерий свидетельствует об экспрессии генов, кодирующих функциональные белки (Logue et al., 2008). Таким образом, транскриптомные исследования потенциально могут предоставить информацию о конкретных функциях, присущих бактериальному сообществу.

Тем не менее, ряд особенностей метатранскриптомики ограничивает её применимость для изучения биогеохимических функций бактериопланктона. К таким ограничениям относится быстрая деградация мРНК, трудности выделения прокариотической мРНК и удаления гуминовых кислот во время экстракции, различная кинетика транскрипции похожих генов в разных популяциях, низкая корреляция между уровнем мРНК и синтезом соответствующего белка (Maron et al., 2007; Poretsky et al., 2005). Из-за быстрой деградации РНК необходимо проводить выделение как можно быстрее. После выделения РНК и вычитающей гибридизации рРНК проводят обратную транскрипцию мРНК в кДНК, которую и анализи-



руют (Poretsky et al., 2005). Существуют протоколы метатранскриптомного анализа с применением ДНК-микрочипов, но их чувствительность к наличию транскриптов ограничена числом зондов на чипе (Nardini et al., 2010).

Как в случае метагеномики, результаты транскриптомного анализа природных сообществ обладают потенциалом для генерирования новых гипотез о функциях бактериопланктона, но не свидетельствуют о реализации этих функций в природных экосистемах.

#### 1.2.1.1.3 Метапротеомика

Метапротеомика – изучение всех белков природного сообщества микроорганизмов. Так как белки, а именно ферменты, вовлечены в метаболические процессы, метапротеомный анализ представляет собой подходящее средство для оценки функций бактериопланктонного сообщества (Maron et al., 2007). Если обнаружение гена метагеномными методами не означает, что этот ген экспрессируется в белок, то наличие самого белка уже может с большей уверенностью свидетельствовать о реализации конкретной биогеохимической функции. После выделения из клеток бактерий и последующего разделения белков в геле проводится их идентификация методом высокоэффективной пептидной ионизации с помощью масс-спектрометрии (Maron et al., 2007).

Некоторые авторы считают, что метапротеомные исследования природных образцов будут более эффективны, если их дополнить информацией о видовом составе сообщества (Wilmes, Bond, 2006). Однако, как и все прочие «омика»-методы, метапротеомика не может дать ответа на вопрос: какой вид бактерии выполняет конкретную функцию? Состав метапротеома может лишь служить дополнением к другим методам изучения биогеохимических функций, предоставляя информацию о наборе ферментов, имеющихся у сообщества.

Отмечено, что по сравнению с предполагаемым потенциалом метапротеомики, полученные с её применением результаты пока ещё очень скудны

(Schneider, Riedel, 2010). Текущие исследования в основном сосредоточены на простых микробных сообществах, таких как сообщества активного ила или кислотного шахтного водоотлива (Wilmes, Bond, 2006). Из сложных бактериопланктонных сообществ трудно выделить всё разнообразие белков. Основные сложности метапротеомного анализа – это широкий спектр уровней экспрессии белков в бактериальных клетках и огромная генетическая гетерогенность бактериальных популяций. Вероятно, в будущем постоянно улучшающиеся методы выделения белков вместе с достижениями в технологии масс-спектрометрии и стабильно растущим фондом данных биоинформатики помогут преодолеть трудности и ограничения метапротеомных исследований. Однако даже в таком случае метапротеомика не станет самостоятельным методом определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона.

#### 1.2.1.1.4 Метаболомика

Изучение метаболома – полного набора метаболитов, продуцируемых в организме – отражает ферментативные пути и сети, закодированные в геноме (Tang, 2011). Метаболомика дополняет данные функциональной геномики, потому что интермедиаты биохимических реакций играют важную роль в объединении различных метаболических реакций, происходящих в клетке. Анализ метаболитов проводится с помощью методов ядерно-магнитного резонанса и масс-спектрометрии (Tang, 2011). Однако изучение только метаболитов сообщества не может дать достаточной информации о функциональной роли бактериопланктона. Метаболомика может быть взята на вооружение исследователями биогеохимических функций бактериопланктона лишь как дополнительный метод.

#### 1.2.1.2 Амплификация геномов единичных клеток

Как уже отмечалось выше, прямое секвенирование ДНК сообщества (метагеномика) не подходит для сборки геномов отдельных членов сложного природ-

ного сообщества потому, что не позволяет узнать, какому виду бактерий принадлежит обнаруженный в сообществе функциональный ген. Исследование ДНК отдельных клеток бактерий можно провести с помощью так называемой амплификации геномов единичных клеток (Nardini et al., 2010). Бактериальные клетки разделяют разбавлением, микроманипуляцией или сортировкой флуоресцентно активированных клеток. Далее геномную ДНК клетки особым образом амплифицируют и определяют её нуклеотидную последовательность. Нужно учитывать, что не всегда удаётся выделить всю геномную ДНК из одной бактериальной клетки, а также что в ходе ПЦР могут происходить перестановки нуклеотидных последовательностей.

Амплификация геномов единичных клеток позволяет обнаружить функциональные гены конкретных видов некультивируемых бактерий, и может использоваться как дополнение к методам определения биогеохимической функции бактериопланктона, речь о которых пойдёт далее.

### 1.2.2 Методы с добавками питательных веществ

Самый логичный способ установить биогеохимические функции гетеротрофного бактериопланктона – добавить органический субстрат в населённую им воду и посмотреть, какие виды бактерий это вещество потребляют. Многие авторы полагают, что с помощью методов с добавками органических веществ можно получить важную информацию о видоспецифичной биогеохимической функции бактериопланктона в том случае, если данные методы используются в сочетании с методом экспериментальных микроэкосистем (мезоэкосмов) (Carlson et al., 2002; Giovannoni, Stingl, 2005; Schafer et al., 2001; Zubkov et al., 2008; Трусова, Гладышев, 2006). Суть метода экспериментальных микроэкосистем (МЭС) состоит в том, что бактериопланктон в них функционирует как часть природного сообщества планктона и лишь интересующий исследователя биогеохимический процесс усиливается добавлением тестируемых питательных веществ. Бактериальное со-

общество в микроэкосистемах должно оставаться цельным потому, что межпопуляционные взаимодействия бактерий, а также воздействие популяций консументов, например, простейших в конечном итоге влияют на реализацию в экосистеме тех или иных биогеохимических функций конкретных видов бактериопланктона. Только в условиях *in situ* можно ожидать, что бактерия выполняет свою «природную» функцию (Hofle et al., 2008).

Проблему определения роли отдельных таксонов бактерий в экосистеме усложняет тот факт, что в стабильных бактериальных сообществах активно экспрессируется лишь малая часть метаболического потенциала и изменчивости этого сообщества (White, 1995). Бактерии находятся в состоянии готовности извлечь выгоду из питательных веществ, которые становятся доступными после вмешательства экспериментатора. Потребление некоторыми видами бактерий питательных веществ начинается только при добавлении этого вещества в значительном избытке, а значит, нельзя делать вывод, что бактерия питается этим веществом и в обычных условиях.

Предполагается, что структура микробного сообщества изменяется в микроэкосистемах так же, как изменялась бы в естественном водоёме при аналогичном вмешательстве (Caron, Countway, 2009). Экспериментальный подход способен дать относительно точные оценки активности сообщества, и ему в настоящее время практически нет альтернатив.

Все описанные в этом разделе методы используются совместно с культивированием бактериопланктонного сообщества в экспериментальных микроэкосистемах с добавками питательных веществ. Цель применения описанных ниже методов – установить, какой вид (или иной таксон, в зависимости от филогенетического разрешения метода) бактериопланктона потреблял добавленный субстрат.

### 1.2.2.1 Мечение стабильными изотопами

Действенным способом изучения потребления бактериопланктоном различных субстратов являются их мечение стабильными изотопами (SIP – stable isotope probing) (Hofle et al., 2008; Radajewski et al., 2000). Обычно в качестве меток используются изотопы  $^{13}\text{C}$  или  $^{15}\text{N}$  – стабильные, но сравнительно редко встречающиеся в природе атомы. Атомы дейтерия  $^2\text{H}$  не применяются, поскольку водород может поступать в бактериальные клетки не только из питательных веществ, но и из воды культуральной среды (Kreuzer-Martin, 2007).

После экспозиции в среде, содержащей меченое вещество, бактерии, поглотившие его, имеют повышенное содержание тяжёлого изотопа в своём составе. Обычно определяется включение метки в ДНК, РНК или мембранные липиды клеток, такие как жирные кислоты полярных липидов, реже бифитаниловые тетраэфиры, гопаноиды (Adamczyk et al., 2003; Kreuzer-Martin, 2007). Меченые ДНК или РНК отделяются от немеченых с помощью центрифугирования в градиенте плотности, и затем анализируется видовой состав бактерий, поглотивших стабильный изотоп (Kreuzer-Martin, 2007). Состав фосфолипидов анализируются изотопной масс-спектрометрией или газовой хромато-масс-спектрометрией (Gray, Head, 2001).

#### 1.2.2.1.1 Анализ липидов

Анализ липидов на содержание изотопных меток более чувствителен, чем анализ нуклеиновых кислот (Kreuzer-Martin, 2007). Все липиды образца, как меченые, так и нет, выделяются вместе и разделяются газовой хроматографией. Этим методом выявляются даже небольшие различия в содержании  $^{13}\text{C}$  в молекулах. Чувствительность особенно значима, когда экспериментальные условия не позволяют добиться высокого уровня включения меток. К таким условиям относятся ограничения продолжительности эксперимента и доступность сообществу альтернативных источников исследуемого атома. Перечисленные факторы могут

препятствовать включению количества меток, достаточного для их идентификации в составе нуклеиновых кислот. В таком случае предпочтительней анализ липидов.

Исследуя липиды, трудно определить филогенетическую принадлежность бактерий, потребивших меченый субстрат. Одинаковые жирные кислоты могут синтезироваться разными видами, и профили жирных кислот отдельных организмов могут изменяться в зависимости от условий окружающей среды. Липиды всех организмов сообщества экстрагируются совместно, и липидные профили некультивируемых бактерий, как правило, неизвестны. Определение включения метки в жирные кислоты сообщества бактериопланктона информативно в лишь тех ситуациях, когда метаболически активно ограниченное число организмов, или эти организмы синтезируют видоспецифичные жирные кислоты.

#### 1.2.2.1.2 Анализ ДНК

Определение меток в ДНК предпочтительней в большинстве случаев, когда продолжительность эксперимента не является ограничением. Существенным преимуществом мечения ДНК стабильными изотопами является то, что обогащённая тяжёлыми изотопами ДНК заключает в себе весь геном каждого функционально активного члена сообщества (Gray, Head, 2001). Клонирование больших фрагментов меченой ДНК с использованием векторных молекул открывает возможности для более тщательного геномного анализа некультивируемых бактерий, выполняющих специфические биогеохимические функции. На основании полученных данных можно конструировать зонды для таких методик как флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) (Kreuzer-Martin, 2007). Некоторые исследователи отмечали, что иногда меченая и немеченая фракции ДНК недостаточно разделяются по градиенту плотности, и фракция меченой ДНК оказывается с примесью немеченой (Kreuzer-Martin, 2007). Однако были разработаны подходы, позволяющие добиться полного разделения фракций (Chauhan, Ogram, 2006). Недостатком анализа

меченой ДНК является необходимость проводить эксперимент достаточно долго для того, чтобы произошла репликация (Kreuzer-Martin, 2007). Время репликации варьирует для различных видов бактерий и зависит от условий окружающей среды. Чем дольше проводится эксперимент, тем больше вероятность, что добавленное питательное вещество метаболизируется бактериями до химических соединений, доступных для потребления другими видами бактериопланктона. ДНК организмов, потребивших метаболиты меченых веществ, также окажется меченой и будет выделена вместе с ДНК бактерий, потребивших исходно добавленное вещество.

#### 1.2.2.1.3 Анализ РНК

Анализ РНК, меченой стабильными изотопами, совмещает в себе возможности идентификации бактериопланктона, потребившего меченый субстрат, и преимущества непродолжительного времени инкубации. РНК организма включает в свой состав изотопные метки быстрее, чем ДНК (Adamczyk et al., 2003). Скорость включения меток в РНК сильно варьирует в зависимости от различных факторов: типа субстрата, стабильности РНК и метаболизма организма потребителя. Перечисленные факторы необходимо учитывать при выборе продолжительности эксперимента. К недостаткам анализа меченой РНК относится её нестабильность.

Общий недостаток всех методов, основанных на добавках питательных веществ с мечеными атомами состоит в том, что бактерии поглощают не только меченые, но и природные немеченые субстраты, вследствие чего уменьшается относительное количество меток, включающихся в ДНК (Radajewski et al., 2000). Чтобы обеспечить достаточное для детекции количество изотопных меток, необходимо добавлять меченый субстрат в избыточном количестве по сравнению с естественной концентрацией субстрата и использовать длительное время инкубации для увеличения уровня включения метки. Добавление высоких концентраций питательного вещества может спровоцировать рост копиотрофных организмов, ко-

торые в природных условиях не имеют возможности активно функционировать (Gray, Head, 2001). Увеличение времени инкубации также может привести к образованию меченых метаболитов, которые ассимилируются вторичными потребителями. Тем не менее, можно проследить поток метки по пищевой цепи редуцентов сообщества, многократно отбирая пробы через некоторые промежутки времени после добавления меченых субстратов. После отбора проб выделяют ДНК и получают электрофорезные профили фрагментов генов 16S рРНК из немеченой и меченой фракций. Затем определяют нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК бактерий, потребивших метку. Сравнивая полученные последовательности генов с базами данных, проводят филогенетический анализ и идентифицируют организмы, которые последовательно инкорпорируют углерод из первичного субстрата. Отдельный эксперимент с добавкой меченого промежуточного продукта деградации исследуемого субстрата также поможет идентифицировать потребителей этих метаболитов (Gray, Head, 2001).

Несмотря на некоторые ограничения, использование стабильных изотопов — надёжный метод для определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона в природных сообществах.

#### 1.2.2.2 Применение бромдезоксиуридина и йоднитротетразолия фиолетового для определения биогеохимических функций бактериопланктона

В качестве более простой методически альтернативы изотопным меткам применяют вещества бромдезоксиуридин и йоднитротетразолий фиолетовый, являющиеся индикаторами метаболической активности бактериальных клеток. Аналог тимидина бромдезоксиуридин добавляется в экспериментальную микроэкосистему в качестве метки одновременно с исследуемым питательным веществом. Метаболически активные клетки потребляют бромдезоксиуридин, причём чем более метаболически активна клетка, тем больше бромдезоксиуридина она включает в свою ДНК. ДНК, содержащая бромдезоксиуридин, при помощи мето-



дики иммунозахвата может быть отделена от ДНК, которая не содержит данный аналог тимидина (Gray, Head, 2001).

Насыщенная бромдезоксисуридином ДНК метаболически активных членов микробного сообщества визуализируется иммунофлуоресцентным методом. Для этого используются антибромдезоксисуридиновые моноклональные антитела или флуоресцентно меченные вторичные антитела. Также меченая бромдезоксисуридином ДНК может быть изолирована иммунохимическим захватом с использованием парамагнитных шариков, покрытых антителами.

Йоднитротетразолий фиолетовый, как и бромдезоксисуридин, может быть использован для обнаружения и последующей идентификации активных членов микробного сообщества, реагирующих на экспериментальные добавки веществ (Gray, Head, 2001). Йоднитротетразолиевый метод используется для изучения отклика бактериопланктона на добавление окисляемых бактериями субстратов. При дыхательной активности бактерий тетразолиевые соли восстанавливаются с образованием нерастворимых кристаллов формазана внутри клетки. Внутриклеточное отложение формазана изменяет плотность активных клеток, что позволяет разделить их центрифугированием в градиенте плотности для последующего анализа сообщества, аналогичного анализу при мечении ДНК стабильными изотопами.

Недостаток метода с использованием йоднитротетразолия фиолетового и бромдезоксисуридина состоит в том, что не исключена селективная стимуляция бактерий, бывших неактивными до добавления избыточных количеств субстрата. Применение йоднитротетразолия фиолетового ограничено тем, что его восстановление связано со специфическими сайтами восстановления в клеточных электрон-транспортных цепях. Некоторые бактерии могут вовсе не восстанавливать йоднитротетразолий фиолетовый или делать это в недостаточных количествах для разделения клеток центрифугированием. Существенным ограничением метода с применением бромдезоксисуридина является то, что не все гетеротрофные микробные популяции потребляют нуклеотиды, даже когда они метаболически активны. В таком случае активно потребляющая добавленное вещество клетка не

накапливает бромдеоксиуридин и не визуализируется как метаболически активная. Итак, применение бромдеоксиуридина и йоднитротетразолия фиолетового для определения биогеохимических функций бактериопланктона является менее информативным по сравнению с методом стабильных изотопов.

### 1.2.2.3 Методы, основанные на флуоресцентной гибридизации *in situ*

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) позволяет идентифицировать, установить местонахождение и подсчитать единичные микробные клетки и кластеры (Schramm, 2003). Клетки гибридизуются с флуоресцентно мечеными олигонуклеотидными зондами, комплементарными специфическим участкам гена 16S рРНК, после чего исследуются под микроскопом. Зонды, специфичные для определённых таксонов, подбираются в базах данных (Pernthaler, Amann, 2005).

Применение FISH для изучения бактериопланктона может вызвать некоторые методические трудности, такие как слабый сигнал, высокая фоновая флуоресценция и погрешности при подсчёте клеток (Schramm, 2003). Кроме того, не просто подобрать специфичные зонды для некультивируемых микроорганизмов. Иногда ограничением FISH является нацеленность этого метода на рибосомальные РНК. Гены рРНК являются высоко консервативными, и их филогенетическое разрешение меньше, чем у функциональных генов, или более переменных кодирующих участков бактериального генома, таких как межгенные разделительные участки (Gray, Head, 2001). Для FISH важно тщательно подбирать зонды, позволяющие детектировать целевые группы с минимальным включением ложных положительных результатов (Yokokawa, Nagata, 2010). Кроме того, эффективность гибридизации варьирует в различных таксонах, что может привести к систематической ошибке в оценке структуры сообщества. С помощью FISH бактерии не идентифицируют до вида, а определяют их принадлежность к более крупным таксонам.

Для увеличения точности и чувствительности метода вплоть до количественной оценки активности единичной клетки, вместо стандартной флуоресцентной гибридизации используется технология CARD-FISH. Метод CARD-FISH основан на применении меченых молекул тирамина. Тирамины – это фенольные соединения, используемые для амплификации флуоресцентного сигнала (Pernthaler et al., 2002). Меченные флуорохромом тирамины откладываются в месте гибридизации. Накопление флуоресцентных молекул в месте гибридизации приводит к сильному увеличению чувствительности FISH по сравнению с обычными зондами. Ещё одна разновидность метода – RING-FISH, основана на применении множественно меченных полинуклеотидных зондов, которые организуются в большие сети вокруг целевой последовательности (Logue et al., 2008).

FISH широко используется для идентификации групп бактерий различных микробных сообществ в сочетании с методами, позволяющими проследить потребление определённых субстратов.

#### 1.2.2.3.1 Комбинация микроавторадиографии с флуоресцентной гибридизацией *in situ*

Микроавторадиография позволяет проследить потребление отдельными клетками веществ, меченных радиоактивными изотопами  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{33}\text{P}$  или  $^{35}\text{S}$  (Gray, Head, 2001; Hofle et al., 2008). Изначально микроавторадиография использовалась для изучения потребления различных субстратов культивируемыми бактериями (Andreasen, Nielsen, 1997). Совместное применение с флуоресцентной гибридизацией *in situ* позволяет также идентифицировать некультивируемые бактерии, потребившие меченый субстрат (Ouverney, Fuhrman, 1999). Используется несколько незначительно различающихся между собой методов: комбинации микроавторадиографии с FISH (MAR-FISH и Micro-FISH) и комбинация отслеживающей субстрат авторадиографии с FISH (STAR-FISH) (Hofle et al., 2008).

Наиболее важное преимущество микроавторадиографии – это возможность проследить включение одной клеткой меченых радионуклидом компонентов (Hofle et al., 2008). К недостаткам метода микроавторадиографии в комбинации с FISH относится его трудоёмкость, что ограничивает количество проводимых параллельно экспериментов (Adamczyk et al., 2003). Меченые субстраты, метаболизируемые первичными потребителями, могут утилизироваться другими участниками микробной пищевой цепи, которые не потребляют первоначальный добавленный субстрат. Бактерии, потребляющие метаболиты, также окажутся мечеными радиоактивными изотопами, что может привести исследователей к ложным выводам. Краткое время инкубации снижает, но не исключает проблему потребления метаболита бактериями, не потребляющими исходное питательное вещество.

В некоторых случаях использование метода микроавторадиографии приводило к неоднозначным выводам. Например, комбинация авторадиографического определения включения субстрата и флуоресцентной гибридизации *in situ* (STAR-FISH) использовалась для выяснения биогеохимических функций морских планктонных архей (Ouverney, Fuhrman, 1999). После добавления смеси  $^3\text{H}$ -меченных L-аминокислот в пробы воды около 60% архей включало радиоактивную метку, и на этом основании они были отнесены к гетеротрофам. Однако последующие исследования показали, что археи являются в основном хемоавтотрофами (Fuhrman, Steele, 2008). Включение меченого субстрата свидетельствует только об активности транспортной системы организма, а не о способности археи или бактерии дышать и расти в данных условиях или запасать субстрат в качестве резервного вещества (Andreasen, Nielsen, 1997). Тем не менее, микроавторадиографические исследования существенно расширяют наши знания о биогеохимических функциях микробных сообществ (Cottrell, Kirchman, 2000).

#### 1.2.2.3.2 Комбинация спектроскопии комбинационного рассеяния света, изотопных меток и флуоресцентной гибридизации *in situ*

Включение меченых субстратов отдельными клетками некультивируемых бактерий может быть с высокой чувствительностью изучено с помощью совместного применения FISH, стабильных изотопов и микроспектроскопии комбинационного рассеяния света (в англоязычной литературе сокращённо обозначается Raman-FISH по фамилии одного из первооткрывателей явления комбинационного рассеяния). В спектроскопии комбинационного рассеяния света (Раман-спектроскопия) используется возбуждающий лазер, чтобы измерить вибрационную энергию химических связей в образце. Рассеянный свет лазера улавливается фотокамерой, и получается спектр комбинационного рассеяния с различными пиками (Neufeld et al., 2007).

Спектроскопия комбинационного рассеяния света позволяет определить структуру химических связей в биологических молекулах отдельной микробной клетки (Huang et al., 2007). Включение стабильного изотопа  $^{13}\text{C}$  в микробную клетку вызывает значительное изменение наблюдаемого резонансного спектра по сравнению с обычным спектром, свойственным молекуле с атомами  $^{12}\text{C}$ . Поскольку частота колебаний обратно пропорциональна квадратному корню атомной массы, после включения тяжёлых изотопов молекулярная масса увеличивается, и происходит модификация колебательного состояния связи. Эта модификация колебания связи была названа «красным смещением» из-за образования более длинных волн в спектре комбинационного рассеяния света. Исследования также показали, что спектральные сдвиги не зависят от вида исследуемой бактерии и коррелируют с содержанием меченого атома в клетке, и таким образом, микроспектроскопия комбинационного рассеяния света представляет собой количественный метод (Neufeld et al., 2007).

Хуанг с соавторами (Huang et al., 2007) продемонстрировал возможность использования Raman-FISH для исследования биогеохимической функции микро-

организмов на уровне одной клетки в комплексных пробах, используя  $^{13}\text{C}$ -меченный субстрат. По сравнению с MAR-FISH, Raman-FISH имеет схожее или большее разрешение и не нуждается в применении радиоактивных изотопов в качестве метки. Raman-FISH позволяет количественно анализировать включение стабильных изотопов на уровне одной клетки.

Ключевые преимущества комбинации Раман-спектроскопии, изотопных меток и флуоресцентной гибридизации *in situ* заключаются в следующем: 1) более высокое пространственное разрешение по сравнению с MAR-FISH (примерно 1 мкм), 2) возможность использовать стабильные изотопы в качестве метки, 3) получение информации о том, в какой компонент клетки включается субстрат.

В перспективе для совершенствования метода Raman-FISH необходимо выяснить, вызывают ли красное смещение субстраты, меченные другими стабильными изотопами (например,  $^{15}\text{N}$ ), и определить, нужны ли калибровочные кривые для каждой пары конкретного организма и меченого субстрата. Если красное смещение одинаково по величине для большого числа микроорганизмов и субстратов, тогда метод применим для некультивируемых бактерий в природной среде (Huang et al., 2007).

В случае с RAMAN-FISH действует ограничение, общее для всех анализов, основанных на FISH: гибридизованные клетки должны быть относительно многочисленными для микроскопической детекции (Neufeld, Murrell, 2007).

#### 1.2.2.3.3 Мультиизотопная визуализирующая масс-спектрометрия

Самым чувствительным методом регистрации включения изотопных меток в клетку является мультиизотопная визуализирующая масс-спектрометрия (MIMS – multi-isotope imaging mass spectrometry) (Hofle et al., 2008). Это новое поколение вторичной ионной масс-спектрометрии (SIMS – secondary ion mass spectrometry), объединённой с FISH, со сложной ионной оптикой и программным обеспечением, количественно анализирующим изображения (Lechene et al., 2006). После инкуба-

ции с субстратами, содержащими стабильные изотопы, количество изотопов в клетках, поглотивших метку, анализируется с очень большим пространственным и массовым разрешением, с высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Технология MIMS позволяет анализировать состав стабильных и радиоактивных изотопов одиночных клеток с боковым разрешением 50 нм, превосходящим Раман-спектроскопию (Neufeld et al., 2007). MIMS в 1000 раз чувствительнее микроавторадиографии и имеет точность учёта стабильных изотопов  $\pm 1\%$ . Как и Raman-FISH, комбинация MIMS с FISH позволяет проводить филогенетический и изотопный анализ природного образца в одно сканирование. Бэрэнс с соавторами (Behrens et al., 2008) объединили собственную модификацию CARD-FISH с MIMS и показали его применимость для установления биогеохимических функций некультивируемых бактерий.

Мультиизотопная визуализирующая масс-спектрометрия была бы идеальным методом для изучения биогеохимической функции бактериопланктона, если бы позволяла идентифицировать все бактерии, потребившие субстрат, до вида.

#### 1.2.2.3.4 Комбинация бета-микроимиджинга с флуоресцентной гибридизацией *in situ*

Бета-микроимиджинг позволяет с высокой чувствительностью измерить распределение радиоактивных изотопов на плоскости (Neufeld et al., 2007). С помощью бета-микроимиджинга можно определить число изотопов, поглощённых бактериальными клетками. Плёнка и эмульсия для авторадиографии заменена более чувствительной системой формирования изображения  $\beta$ -частиц (Laniece et al., 1998). Недостатком метода является относительно низкое пространственное разрешение около 10 мкм, что не позволяет различать отдельные клетки. Обычно бета-микроимиджинг используется совместно с микроавторадиографическим методом или его аналогом, позволяющим изучить распределение изотопов с большим разрешением.

Гизке с соавторами (Gieseke et al., 2005) применяли сочетание микроавторадиографии и бета-микроимиджинга с FISH для изучения потребления субстратов бактериями, населяющими биоплёнки. Преимущества микроавторадиографии позволяли проследить потребление субстрата отдельными клетками, а бета-микроимиджинг применялся для определения количества потреблённого меченого углерода. Треуде с соавторами (Treude et al., 2007) изучали потребление метанотрофными микробиальными матами из Чёрного моря метана и углекислого газа, меченных  $^{14}\text{C}$ . Комбинация разных методов, включая бета-микроимиджинг для изучения количества инкорпорированного меченого углерода, вторичную ионную масс-спектрометрию для исследования распределения меченого углерода и CARD-FISH, позволила выявить микробные консорции метанотрофов. Как дополнительный метод к микроавторадиографии, бета-микроимиджинг был применён для тестирования активности метанобразующих микроорганизмов (Collins et al., 2007).

Из-за низкого пространственного разрешения в настоящее время бета-микроимиджинг подходит только для применения в хорошо структурированных микробных сообществах, таких как сообщества биоплёнок, микробиальных матов и анаэробных гранул очистных сооружений (Neufeld et al., 2007).

#### 1.2.2.2.4 Изотопные чипы

Использование микрочипов для изучения биогеохимических функций бактерий – один из самых высокопроизводительных методов, протестированных на различных бактериальных сообществах (Ward, 2005). Чипы представляют собой стеклянные пластины, на которые нанесены многочисленные зонды (олигонуклеотиды или ПЦР-продукты) в виде множества маленьких точек (Logue et al., 2008). Современный вариант микрочипов выглядит как полиакриламидные «подушечки» со стороной 100 мкм и глубиной 20 мкм (Stahl, 2004). Для идентификации конкретных бактерий, присутствующих в пробе, на микрочип наносят разные



версии одного гена, соответствующие различным организмам. Когда комплементарная ДНК или РНК из пробы бактериопланктона, которая инкубировалась в среде, содержащей субстрат с изотопной меткой, гибридизуется с подходящей последовательностью на чипе и связывается с соответствующей точкой, изотопный рисунок указывает на наличие искомым генов в пробе по их положению на чипе. Метод прямой детекции 16S рРНК микрочипами позволяет одновременно исследовать структуру сообщества и специфичное потребление субстрата его членами (Adamczyk et al., 2003).

Метод изотопных чипов имеет ряд недостатков. Так же, как и в случае с методами мечения стабильными изотопами и комбинации микроавторадиографии с FISH, бывает сложно отличить первичных потребителей субстрата от микроорганизмов, которые живут на продуктах лизиса или на экзометаболитах первичных потребителей. В некоторых исследованиях возникала проблема низкого филогенетического разрешения микрочипов, поскольку они позволяют различать последовательности, отличающиеся более чем на 12% (Wilmes, Bond, 2006). Для сравнения напомним, что другие методы, например сравнение последовательностей генов 16S рРНК, позволяют различать нуклеотидные последовательности, различающиеся на доли процента. Анализ с применением изотопных чипов не позволяет собрать и исследовать геномную ДНК метаболически активных организмов для дальнейшего анализа. Содержащиеся в природных образцах гуминовые кислоты и другие органические вещества могут ингибировать гибридизацию ДНК с микрочипом. Некоторые авторы сомневаются в применимости изотопных микрочипов к изучению сложных природных сообществ (Sharkey et al., 2004).

С другой стороны, у метода изотопных чипов есть несколько уникальных преимуществ. В отличие от методов мечения нуклеиновых кислот стабильными изотопами, изотопные чипы позволяют напрямую измерить включение субстрата в нуклеиновые кислоты-мишени, благодаря чему практически исключены ложноположительные результаты. По сравнению с MAR-FISH, изотопные чипы позво-

ляют применить много зондов параллельно, что помогает быстрее по сравнению с другими методами изучить биогеохимические функции микробных сообществ.

#### 1.2.2.2.5 Метод фингерпринтов («отпечатков пальцев»)

Фингерпринтинг сообществ – быстрый способ увидеть изменения в составе бактериальных сообществ, широко применяется для изучения разнообразных местообитаний, в том числе водных (Yan, Yu, 2011). Метод не позволяет проследить за потреблением питательных веществ отдельными клетками бактериопланктона. Фингерпринты представляют собой профиль сообщества, на котором отдельная полоса ДНК соответствует одной популяции бактерий. Если после добавления питательного вещества популяция увеличила свою долю и заняла доминирующее положение в сообществе, предполагается, что она питается добавленным веществом (Трусова, Гладышев, 2006).

В настоящее время наиболее часто применяемыми для исследования водных экосистем методами фингерпринтинга являются денатурирующий/температурный градиентный гель-электрофорез (ДГГЭ/ТГГЭ), одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP), случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (T-RFLP), рестрикционный анализ амплифицированной рибосомальной ДНК (ARDRA), анализ рибосомальных межгенных промежутков (RISA) и автоматический анализ рибосомальных межгенных промежутков (ARISA) (Yan, Yu, 2011). Все эти методы предоставляют быстрый и воспроизводимый способ оценить изменения в естественных микробных сообществах (Logue et al., 2008). Фингерпринтинг-методики, создающие профиль генетического разнообразия микробных сообществ, дают возможность отслеживать генотипические изменения в сообществе во времени. Наилучшими методами для установления биогеохимической функции отдельных видов являются DGGE, TGGE и SSCP (Nocker et al., 2007), поскольку можно вырезать полоски геля, содержащие ДНК отдельных видов бак-

терий, для последующего определения её нуклеотидной последовательности. Фингерпринтинг – полуколичественный метод, так как получаемые с его помощью профили сообществ подвластны потенциальным смещениям, вызванным ПЦР (неравномерная амплификация генов разных бактерий, образование химерных последовательностей). Полосы на профиле сообщества, соответствующие генам разных видов бактерий, напрямую не транслируются в таксономическую информацию, и предоставляют информацию только о самых многочисленных популяциях (Logue et al., 2008; Zajec et al., 2012). В настоящее время считается, что основанные на ДНК фингерпринты отражают наличие вида в сообществе, а РНК-фингерпринты соответствуют метаболически активным членам сообщества (Brettar et al., 2012).

Фингерпринтинг амплифицированных фрагментов гена 16S рибосомальной РНК с помощью DGGE – полезный подход для мониторинга изменений состава доминирующих видов внутри бактериальных сообществ в экспериментальных микроэкосистемах например, (Ovreas et al., 2003; Schafer et al., 2001; Колмакова, Трусова, 2011; Трусова, Гладышев, 2006; Трусова и др., 2012). Более того, фингерпринтинг позволяет изучать реакцию бактериальных сообществ не только на добавки органических веществ, но и на изменения других физических, химических и биотических факторов среды (Brettar et al., 2006; Brown et al., 2012).

Фингерпринты позволяют следить за изменением структуры бактериопланктонного сообщества во время процесса потребления питательного вещества. Обычно вещество, потребление которого намереваются исследовать, добавляют непосредственно в пробу воды, содержащую всё планктонное сообщество. По увеличению яркости полос на профиле, соответствующих видам-потребителям данного вещества, следят за динамикой бактериального сообщества в ходе эксперимента. Популяции, не потребляющие добавленное вещество, остаются стабильными, плотность соответствующих им полос на профиле не изменяется. Некоторые исследователи используют DGGE совместно с другими методами, позволяющими отделить функционально активную часть сообщества, например, добавляя

бромдезоксиуридин в исходную пробу (Hamasaki et al., 2007). Определение нуклеотидной последовательности ДНК, выделенной из яркой полосы, позволяет сконструировать высокоспецифичные праймеры, используемые для получения последовательности целого гена 16S рРНК. Далее с помощью ПЦР в реальном времени можно установить численность отдельных видов и определить их активность *in situ* и в экспериментальных условиях. Вдобавок, можно использовать данные секвенирования для дизайна олигонуклеотидных зондов для Micro-FISH. Применение Micro-FISH совместно с фингерпринтингом позволило бы подтвердить, действительно ли популяции бактериопланктона, увеличившие свою долю в сообществе, потребляли добавленный субстрат.

### 1.3 Сравнение методов и выбор наиболее оптимального пути для решения поставленных задач

С развитием молекулярно-генетических методов исследования биогеохимических функций бактериопланктона вышли на новый уровень. В экологии бактериопланктона, благодаря совершенствованию инструментария и постоянно растущей производительности методов, остаётся всё меньше белых пятен (Logue et al., 2008).

Методы определения видоспецифичных биогеохимических функций бактериопланктона можно оценить по следующим критериям: 1) филогенетическое разрешение метода; 2) возможность изучить процесс как можно ближе к условиям *in situ*; 3) возможность мониторинга процесса во времени; 4) возможность следить за бактериальным сообществом целиком. Наилучшим филогенетическим разрешением обладают анализ нуклеиновых кислот, меченных стабильными изотопами, и анализ фингерпринтов. Условия, наиболее близкие к *in situ*, позволяют создать методы, комбинированные с FISH (микроавтордиография, RAMAN-FISH, мультиизотопная сканирующая масс-спектрометрия), не нуждающиеся в добавлении больших количеств субстрата для изучения его включения бактериопланк-

тоном. Наилучшим методом для изучения процесса во времени являются фингерпринты. Следить за всем сообществом целиком позволяют изотопные методы. Наиболее адекватным для изучения биогеохимических функций бактериопланктона является использование сочетания нескольких методов, подобранных в зависимости от ситуации и цели исследования. В идеале, для изучения того, какой вид бактериопланктона потребляет данное вещество, можно совместить инкубацию в экспериментальных микроэкосистемах с добавкой питательного вещества, меченого радиоактивным изотопом, фингерпринты и мультиизотопную визуализирующую масс-спектрометрию с FISH. Фингерпринты с последующим филогенетическим анализом позволят отследить динамику популяций в сообществе. Результаты MIMS подтвердят, что увеличившие свою долю популяции действительно потребляли добавленное вещество. FISH подтвердит увеличение численности популяций, доля которых на профиле сообщества возросла в ходе эксперимента. Если филогенетического разрешения FISH будет недостаточно, можно выделенную ДНК сообщества разделить в градиенте плотности для отделения тяжёлой фракции и идентифицировать виды, поглотившие добавленный субстрат.

Многие исследования биогеохимической роли бактериопланктона сосредоточены на выявлении соотношения структуры и функции целостного бактериопланктонного сообщества, хотя с точки зрения других исследователей лучше фокусироваться на отдельных бактериальных популяциях, которые можно идентифицировать, подсчитать и определить их биогеохимические функции в водных экосистемах (Pernthaler, Amann, 2005). Во многих отношениях «бактериопланктонное сообщество» является скорее теоретическим понятием, чем реальным биологическим объектом со своей структурой, геномом и эволюционной историей. Бактериопланктонное сообщество можно рассматривать как свободное собрание отдельных популяций, характеристики которых могут изменяться с течением времени.

Состояние экосистемы зависит от стабильности (способность экосистемы сохранять свою структуру и функциональные свойства при воздействии внешних

факторов), устойчивости (способность экосистемы возвращаться в исходное или близкое к нему состояние после прекращения воздействия) и функциональной избыточности (одинаковая функция выполняется разными популяциями) (Maron et al., 2007). Вышеперечисленные характеристики, хорошо известные для животных и растений, пока ещё мало изучены в микробной экологии. Малоизученность экологических характеристик бактериопланктона связана с огромным таксономическим и функциональным разнообразием микробных сообществ, которые до последнего времени было невозможно идентифицировать. Современные методы определения функциональной роли различных таксонов бактериопланктона помогут решить важнейшие вопросы в микробной экологии, относящиеся к связи между генетическим и функциональным разнообразием, и относительным вкладом таксономического и функционального разнообразия в стабильность экосистем.

Таким образом, одним из оптимальных решений для определения биогеохимической функции бактериопланктона является культивирование целостных сообществ водных бактерий в микроэкосистемах с добавками питательного вещества с последующей молекулярно-генетической идентификацией видов, питающихся этим веществом. Очевидно, что применяемые методы должны давать информацию о динамике численности изучаемых популяций. Как уже отмечалось, динамику популяций отдельных видов в сообществе позволяют отслеживать фингерпринты. Именно культивирование в МЭС с добавками исследуемых веществ (аминокислот) и последующим анализом фингерпринтов на основе ДГГЭ было выбрано нами в качестве метода экспериментального изучения бактериопланктона водохранилища.

## ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Река Енисей

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 (Amon et al., 2012). Также среди этих рек Енисей имеет самый большой сток растворённого и взвешенного органического углерода –  $4,5 \cdot 10^{12}$  г/год и  $0,2 \cdot 10^{12}$  г/год соответственно (Dittmar, Kattner, 2003). К основным экологическим особенностям реки Енисей относится небольшая мутность воды (<100 мг/л), высокое содержание кислорода (~100% насыщение), и жёсткость 21 – 23 мг/л Ca<sup>2+</sup>. Концентрации биогенных элементов PO<sub>4</sub>-P и NH<sub>4</sub>-N, составляют соответственно 0,0 – 0,1 и 0,3 – 1,6 мг/л (Gladyshev et al., 1993). Восточная часть бассейна Енисея в 5,5 раз больше западной (Дрюккер, Петрова, 1988). По гидробиологическим и географическим характеристикам русло Енисея разделено на 3 участка: 1) верхний (от истока р. Большой Енисей до устья Ангары), 2) средний (от устья Ангары до устья Нижней Тунгуски), 3) нижний (от устья Нижней Тунгуски до впадения в Енисейский залив) (Галазий и др., 1993). В нижнем плёсе верхнего течения Енисей протекает через горы Енисейского кряжа. Берега в этом месте скалистые, покрытые тайгой. Река здесь имеет признаки горной, то есть характеризуется высокой скоростью течения 1-3 м/с, значительные глубины чередуются со стремнинами. На данном участке реки располагались трансекты 1 и 2 (рисунок 2.1). В среднем и нижнем течении Енисей проходит через Западно-Сибирскую равнину и область вечной мерзлоты. Здесь Енисей приобретает признаки равнинной реки, и тайга по берегам постепенно заменяется лесотундрой. На данных участках реки располагались трансекты 3-10.



Рисунок 2.1 – Карта-схема участка реки Енисей, на котором проводились исследования в период экспедиции в июне 2012 г. Т1-Т10- трансекты отбора проб, в скобках приведены даты отбора



Первые работы по изучению бактериопланктона Енисея провела исследовательская группа во главе с В.В. Дрюккером в 70-е гг. XX века (Дрюккер, Петрова, 1988). Исследования проводились на всём протяжении реки от истока до устья. Было изучено пространственное распределение и динамика общей численности бактерий, а также доля гетеротрофных и мезофильных микроорганизмов, охарактеризованы физиологические группы культивируемых бактерий, определены биомасса и время генерации бактериопланктона. На участке ниже Красноярского водохранилища авторами отмечены значительные колебания общей численности бактериопланктона (1-4 млн кл./мл) в разные годы и на разных станциях пробоотбора. Также начиная с пос. Коркино численность бактериопланктона была распределена неравномерно по поперечному сечению. Авторы связывают пространственное распределение численности бактерий в нижнем плесе верхнего Енисея с влиянием антропогенных факторов. В среднем Енисее общая численность бактерий низкая во все сезоны года. На нижнем участке от устья Нижней Тунгуски до Енисейского залива численность бактерий возрастает вниз по течению. Наибольшая скорость размножения бактериопланктона на участке от Красноярского водохранилища до пос. Коркино была в марте, наименьшая – в августе 1974 г. На участке реки от устья Ангары до устья Нижней Тунгуски максимум скорости размножения был в июле, а минимум наблюдался в сентябре. Авторы заключают, что по времени удвоения численности бактерий можно судить об интенсивности процессов самоочищения в реке и о влиянии сточных вод на экосистему водотока.

Численность бактериопланктона реки Енисей была позже неоднократно изучена различными авторами (Aronsenko et al., 2010; Meon, Amon, 2004; Korylov et al., 2012), и составляла от 1 до 10 млн. кл./мл.

Первое исследование бактериопланктона реки Енисей с применением молекулярно-генетических методов было осуществлено в середине 2000-х годов Крапом с соавторами (Crump et al., 2009). Пробы воды отбирались в районе г. Дудинка, то есть близко к устью реки. Методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза были получены профили бактериального сообщества в

разные периоды двух вегетационных сезонов. Также была определена нуклеотидная последовательность 80 клонов гена 16S рРНК бактерий методом сэнгеровского секвенирования (Crump et al., 2009).

## 2.2 Водохранилище Бугач

Пробы бактериопланктона отбирали в прибрежной зоне с поверхности водохранилища Бугач – малого водоёма рекреационного и рыбоводного назначения, расположенного в северо-западной части города Красноярска (56°03' с.ш., 92°43' в.д.) (Gladyshev et al., 2007). Водохранилище образовано на вторичном притоке реки Енисей, реке Бугач. Площадь водохранилища около 32 га. Средняя глубина водохранилища – около 2 м, максимальная глубина около плотины составляет 7 м (Gladyshev et al., 2007). Для водохранилища характерна слабая температурная стратификация и относительно низкая прозрачность воды (от 0,25 м до 0,8 м по диску Секки). По содержанию кислорода и рН отмечена вертикальная стратификация, в то время как по температуре стратификация выражена слабо (Kravchuk et al., 2011). Водоем относится к эвтрофным и для него характерны высокие значения рН (от 8.0 до 9.7) и относительно высокие концентрации органического азота и минерального фосфора. Для водоёма характерно летнее «цветение» воды цианобактериями и относительно высокое содержание растворённых органических веществ, включая аминокислоты (Kalachova et al., 2004; Gladyshev et al., 2007; Kravchuk et al., 2011). Среди аминокислот водохранилища Бугач отмечены: лизин в концентрации от 0,05 до 0,8 мг/л, глицин от 0,1 до 0,8 мг/л, аргинин от 0,02 до 0,7 мг/л.

## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1 Отбор проб бактериопланктона Енисея

Полевые работы проводили в июне 2012 г. в ходе экспедиции по среднему и нижнему Енисею на участке от 58° с.ш. (выше впадения правого притока –

р. Ангара) до 69° с.ш. (ниже впадения левого притока – р. Большая Хета) (рисунок 2.1). Пробы были собраны на 10 трансектах, расположенных выше и ниже устьев крупных притоков (таблица 2.1, рисунок 2.1).

Таблица 2.1 – Станции отбора проб на реке Енисей в июне 2012 г.

Дата	Место отбора	Станция	Координаты	
			Широта	Долгота
12.06.12	<b>Трансекта 1</b> Выше р. Ангара	Центр	58°00.801'	93°12.667'
		Правый берег	58°00.894'	93°12.767'
		Левый берег	58°00.727'	93°12.338'
13.06.12	<b>Трансекта 2</b> Ниже р. Ангара	Центр	58°07.586'	92°42.270'
		Правый берег	58°07.604'	92°43.190'
		Левый берег	58°07.115'	92°42.488'
17.06.12	<b>Трансекта 3</b> Выше р. Подкаменная Тунгуска	Центр	61°34.349'	90°09.467'
		Правый берег	61°34.267'	90°11.310'
		Левый берег	61°33.956'	90°10.254'
	<b>Трансекта 4</b> Ниже р. Подкаменная Тунгуска	Центр	61°36'46.62"	90° 0'3.06"
		Правый берег	61°37.194'	90°01.350'
		Левый берег	61°36.266'	90°00.575'
20.06.12	<b>Трансекта 5</b> Выше р. Нижняя Тун- гуска	Центр	65°35.662'	88°02.997'
		Правый берег	65°35.079'	88°03.665'
		Левый берег	65°34.461'	88°00.991'
22.06.12	<b>Трансекта 6</b> Ниже р. Нижняя Тун- гуска	Центр	66°05.124'	87°47.341'
		Правый берег	66°05.561'	87°45.412'
		Левый берег	66°04.563'	87°49.140'
23.06.12	<b>Трансекта 7</b> Выше р. Курейка	Центр	66°25.392'	87°18.337'
		Правый берег	66°25.770'	87°19.772'
		Левый берег	66°25.118'	87°17.322'
24.06.12	<b>Трансекта 8</b> Ниже р. Курейка	Центр	66°32.750'	87°01.940'
		Правый берег	66°33.368'	87°03.163'
		Левый берег	66°32.451'	86°59.461'
28.06.12	<b>Трансекта 9</b> Выше рр. Большая Хе- та и Малая Хета	Центр	69°38.644'	84°32.760'
		Правый берег	69°39.448'	84°32.544'
		Левый берег	69°38.412'	84°34.207'
27.06.12	<b>Трансекта 10</b> Ниже рр. Большая Хета и Малая Хета	Центр	69°43.368'	84°00.114'
		Правый берег	69°43.510'	84°00.358'
		Левый берег	69°42.923'	84°04.111'

На каждой трансекте пробы отбирали на трех станциях, расположенных в центре русла (на стрежне) и у каждого из берегов. Пробы воды с четырех горизонтов, равномерно распределенных по столбу воды, брали вакуумным пробоотборником, сконструированным и изготовленным в Институте биофизики СО РАН. Интегрирование проб по глубине – общепринятая практика при исследовании даже крупных рек (Crump et al., 2009; Holmes et al., 2012), поскольку вертикальных различий в экологических параметрах в них не наблюдается (Gebhardt et al., 2004; Hessen et al., 2010). Параллельно с отбором проб измеряли температуру воды. На первых двух трансектах температуру измеряли термометром Long-Stem Thermometer, F/C, 8, (Cole-Parmer, США), на остальных станциях – с помощью зонда YSI 6600v2 (YSI, США).

### 2.3.2 Постановка экспериментов в МЭС

Эксперименты проводили в лабораторных микроэкосистемах. Пробы воды из водохранилища, содержащие естественный планктон, инокулировали в три МЭС. МЭС представляют собой стеклянные цилиндры 26 см диаметром и 25 см в высоту с рабочим объёмом 10 л, помещённые во внешние контуры охлаждения и термоизоляции. Температура в МЭС поддерживалась циркуляционным криотермостатом KRIO-VT-11 (ИХН СО РАН, Томск, Россия). Температура в каждом соответствовала измеренной в водохранилище в момент отбора проб для инокуляции. МЭС освещались лампами дневного света, освещённость составляла  $7,0 \text{ Вт/м}^2$ . В ходе экспериментов поддерживался естественный периодический режим освещения: фотопериод в I, III, IV, V, VI и VII экспериментах составлял 16 ч свет : 8 ч темнота, во II, VIII и IX эксперименте, проводившихся во второй половине августа и сентябре – 14 ч свет : 10 ч темнота. Перемешивание воды в МЭС производилось один-два раза в сутки стеклянным шпателем. Ранее было установлено, что в данных МЭС в течение 7-10 суток сохраняется и функционирует

естественное планктонное сообщество, включающее фито-, зоо- и бактериопланктон (Гладышев, 1992).

Всего в разное время было проведено 5 экспериментов с добавками различных аминокислот (см. таблицу 2.2). Первые три эксперимента проводились без участия автора, однако молекулярно-генетический анализ проб, собранных в ходе этих экспериментов, частично выполнен автором.

Выбранные для экспериментов аминокислоты глицин, лизин и аргинин являлись характерными кислотами в общем пуле аминокислот водохранилища (Kalachova et al., 2004; раздел 2.2). Однако сезонная динамика концентраций этих кислот в водохранилище была различной, и они происходили из разных источников (Kalachova et al., 2004). Для обеспечения отклика бактериального сообщества на добавляемый субстрат в первых трёх экспериментах были использованы 100-кратные концентрации аминокислот по сравнению с естественным уровнем, затем концентрации были снижены и приближены к естественным.

Таблица 2.2 – 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

### 2.3.3 Отбор проб в ходе экспериментов

При заполнении МЭС бралась исходная проба воды, далее после внесения добавки ежедневно в течение 5-6 суток отбиралось по 100 мл воды из каждой МЭС для анализа состава бактериопланктона методом ДГГЭ.

В экспериментах III и V ежедневно отбиралось 10-50 мл воды из каждой экспериментальной МЭС для определения динамики добавленных аминокислот. Также в начале и в конце эксперимента V отбиралось по 500 мл воды для определения пула взвешенных и растворенных аминокислот, а также аминокислот сестона. Для определения концентраций взвешенных и растворенных аминокислот пробы воды концентрировали выпариванием на водяной бане. Для определения суммарных аминокислот сестона пробы объемом 500 мл фильтровали через мембранные фильтры МФАС-ОС-2 (Владипор, размер пор 0,45 мкм), покрытые слоем прокаленного  $BaSO_4$  для облегчения отделения осадка. Фильтры высушивали, затем осадок отделяли от фильтра. Для аминокислотного анализа сухой осадок переносили в толстостенную стеклянную ампулу объемом 50 мл и добавляли 20 мл 6N HCl. Ампулу запаивали, гидролиз сухого осадка проводили в термостате 22 часа при 110°C. Затем пробу остужали, фильтровали и выпаривали кислоту на кипящей водяной бане, добавляя небольшое количество воды для удаления следов кислоты. Осадок растворяли в цитратном буфере pH 2,2. Для определения концентрации аминокислот использовали ВЭЖХ хроматограф Knauer A0326V2 (Германия) с колонкой Knauer A0992-13v1 (Германия) 125 × 3 мм, нингидриновым реакционным блоком и УФ-детектором 2500. Предел обнаружения составлял 0,1 нмоль. Определение содержания аминокислот в воде и сестоне МЭС проводила к.б.н. А.А. Колмакова.

## 2.3.4 Выделение геномной ДНК

### 2.3.4.1 Бактериопланктон Енисея

Бактериопланктон концентрировали из объёма 0,65-1 л фильтрованием на мембранных фильтрах с диаметром пор 0,22 мкм. Фильтры хранили в морозильной камере при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для подсчёта количества клеток бактерий 4,8 мл воды фиксировали 0,2 мл глутаральдегида и хранили при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ .

Геномную ДНК из бактериопланктона, сконцентрированного на фильтрах, выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва) по протоколу Gram-Positive Bacteria Genomic DNA Purification Protocol.

### 2.3.4.2 Бактериопланктон МЭС

Бактериопланктон концентрировали из объёма 100 мл фильтрованием на стерильных бактериальных фильтрах с диаметром пор 0,22 мкм. Геномную ДНК из бактериопланктона, сконцентрированного на мембранах, выделяли по методу Бострема с соавторами (Boström et al., 2004). Для этого мембраны разрезали на части, помещали в стерильные 2 мл пластиковые пробирки и добавляли 525 мкл лизирующего буфера (400 мМ NaCl, 750 мМ сахароза, 20 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl pH 9,0) и 11 мкл раствора лизоцима (конечная концентрация 1 мг/мл), инкубировали 30 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Затем в пробирки добавляли 60 мкл раствора додецилсульфата натрия (SDS, конечная концентрация 1%) и 3 мкл раствора протеиназы К (конечная концентрация 100 мкг/мл) и инкубировали при  $55^{\circ}\text{C}$  12 ч. Продукты лизиса переносили в чистые пробирки, фильтры дополнительно промывали 500 мкл TE буфера (10 мМ Tris-HCl pH 8,0, 2 мМ ЭДТА), который затем объединяли с лизатами. К ДНК-содержащим растворам добавляли 1/10 объёма 3 М раствора ацетата натрия, перемешивали и осаждали ДНК 2,5 объёмами 96% этанола при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч. Пробирки центрифугировали 20 мин при 20000 g и  $4^{\circ}\text{C}$ . Осад-

ки промывали 70% этанолом. После удаления этанола осадки подсушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл буфера TE.

Качество и количество выделенной высокомолекулярной ДНК анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

### 2.3.5 Амплификация фрагмента гена 16S рРНК

#### 2.3.5.1 Бактериопланктон Енисея

Перед созданием библиотеки ампликонов проводилась амплификация нужного участка гена с праймерами без баркода, как рекомендовано в (Berry et al., 2011). Температура отжига была задана очень низкая для выбранной пары праймеров, так что фрагменты, которые не полностью комплементарны праймерам, не были потеряны. В таких условиях дополнительные свисающие концы ведут к неспецифическим продуктам, и в некоторых случаях реакция не проходит, потому что температура плавления праймеров с баркодами и адаптерами высокая.

Хотя определение нуклеотидной последовательности коротких фрагментов позволяет сравнивать и идентифицировать известные виды, для более точного таксономического определения неизвестных бактерий предпочтительней использовать более длинные фрагменты. Для молекулярно-генетического анализа предпочтителен вариабельный участок, окруженный консервативными фрагментами (Baker et al., 2003; Wang, Qian, 2009). V3 и V4 гипервариабельные участки гена 16S рРНК амплифицировали из суммарной геномной ДНК бактериопланктона с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами 341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') и 806R (5'-GGA CTA CHV GGG TAT CTA AT-3').

Реакционная смесь для ПЦР объемом 30 мкл содержала: 0,67 мкМ праймеры, 0,33 мкМ dNTP, 0,7 мкл полимеразы Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, США) и 6 мкл соответствующего буфера 5x Herculase II Reaction Buffer, 10 нг ДНК. Для двух образцов в реакционную смесь также добавляли BSA



для нивелирования эффектов ингибиторов ПЦР. ПЦР проводили на приборе MyCycler (Bio-RAD, США) в следующем температурно-временном режиме: начальная денатурация - 95°C, 2 мин; 6 циклов - 95°C, 20 сек; 48°C, 30 сек; 68°C, 2 мин; затем 26 циклов - 95°C, 15 сек; 52°C, 25 сек; 68°C, 2 мин; и окончательная полимеризация при 72°C, 5 мин. Для контроля контаминации ставили отрицательную контрольную реакцию, в которую вместо ДНК-матрицы добавляли стерильную воду. Количество и качество продуктов ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле.

#### 2.3.5.2 Бактериопланктон МЭС

Фрагмент гена 16S рРНК амплифицировали с универсальными праймерами GC-341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', с "GC-clamp" 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C-3' на 5'-конце) и 926R (5'-CCG TCA ATT CA/CT TTG AGT TT-3') (Schauer et al., 2000). ПЦР-смесь была оптимизирована под данную пару праймеров и содержала 75 мМ Tris-HCl (рН 8,8 при 25°C), 0,01% Tween 20, 20 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2% диметил сульфоксид (ДМСО), 10 мкг БСА, 0,25 мМ dNTP, 1 мкМ праймеры, 0,25 ед. акт. Taq DNA полимеразы и матрицу. ПЦР проводили в следующих условиях: 95°C начальная денатурация, один цикл – денатурация 95°C в течение 30 с; отжиг 63°C – 40 с; элонгация 72°C – 50 с; затем температура отжига понижалась на 1°C за цикл в течение 10 циклов; 20 циклов - 95°C, 30 с; 53°C, 40 с; 72°C, 50 с; и финальная полимеризация при 72°C в течение 7 минут.

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,2% агарозном геле. ПЦР-продукты концентрировали спиртовым переосаждением и использовали 800 нг полученной ДНК для анализа методом ДГГЭ.

### 2.3.6 Получение библиотеки ампликонов гена 16S рРНК бактериоплактона Енисея

1 мкл ПЦР-продукта использовался в качестве матрицы для получения библиотеки ампликонов с применением баркодированных прямого (343F) и обратного (806R) праймеров (Caporaso et al., 2012):

343F – 5' – AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC xxxxxxxx  
AGTCAGTCAG GT CTCCTACGGRRSGCAGCA

806R – 5' - CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT xxxxxxxx  
ACGTACGTACG CC cGGACTACNVGGGTWTCTAAT

Для каждого образца было использовано уникальное сочетание баркодированных праймеров с адапторами для технологии секвенирования Illumina.

Реакционная смесь для ПЦР объемом 25 мкл содержала: 0,9 мкМ dNTP, 0,2 мкМ праймеры, 7% DMSO, 0,2 мкл полимеразы Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent, США) и 5 мкл соответствующего буфера 5x Herculase II Reaction Buffer. ПЦР проводили на приборе MyCycler (Bio-RAD, США) в следующем температурно-временном режиме: начальная денатурация - 94<sup>0</sup>С, 2 мин; 5 циклов - 94<sup>0</sup>С, 10 сек; 50<sup>0</sup>С, 10 сек; 72<sup>0</sup>С, 30 сек; затем 25 циклов - 94<sup>0</sup>С, 10 сек; 53<sup>0</sup>С, 10 сек; 72<sup>0</sup>С, 30 сек; и окончательная полимеризация при 72<sup>0</sup>С, 3 мин. Количество и качество продуктов ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле.

ПЦР продукты очищали с использованием набора GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).

### 2.3.7 Определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК бактериоплактона Енисея методом секвенирования следующего поколения (NGS)

Секвенирование NGS проводилось на платформе Illumina MiSeq с набором реагентов MiSeq reagent kit v.2 (Illumina, США) в лаборатории эволюционной ге-

номики Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова. Секвенирование и предварительная очистка прочтений (сиквенсов) проводились согласно (Caporaso et al., 2011).

### 2.3.8 Биоинформатический анализ данных NGS

Прочтения с обоих концов соединяли в единые последовательности с помощью программы PANDAseq (Masella et al., 2012). В общей сложности 487228 прочтений последовательностей гена 16S rRNA были отфильтрованы, очищены от шума и обработаны с помощью конвейерного программного обеспечения QIIME v. 1.7.0 (Caporaso et al., 2010). Качество прочтений было проверено с помощью встроенного инструмента USEARCH v5.2.236 (Edgar, 2010). Сначала прочтения отфильтровали по длине по уменьшению. Затем была проведена кластеризация прочтений в группы, где каждая последовательность точно совпадала с фрагментом затравочной последовательности каждого кластера. Последовательности затем снова фильтровали от самой длинной до самой короткой последовательности, и проводили кластеризацию последовательностей по 97% соответствию. Проверка и фильтрация химерных последовательностей осуществлялась de-novo и сравнением с референтной базой данных gold (URL: <http://drive5.com/uchime/gold.fa>) с помощью инструмента UCHIME. Очищенные от химерных последовательностей кластеры отсортировали по размеру и удалили из рассмотрения кластеры, не содержащие по меньшей мере 4 последовательности. После фильтрации по качеству удаления химер и шума остались 257714 последовательности, кластеризованные в 3226 операционных таксономических единиц (OTU). Таксономическая принадлежность репрезентативной последовательности каждой операционной таксономической единицы была уточнена сравнением с базой данных Greengenes версия 13\_5, содержащей высококачественные проверенные последовательности 16S рРНК (DeSantis et al., 2006; McDonald et al., 2012) с помощью алгоритма UCLUST

v1.2.22q. 204 операционных таксономических единицы были классифицированы как хлоропласты водорослей и удалены.

Вычисление альфа-разнообразия проводили на наилучшем доступном таксономическом разрешении. Отдельные пробы (30) были разрежены до наименьшего числа прочтений на образец (4460), с 10 повторами используя QIIME. Индекс разнообразия Шеннона рассчитывали общепринятым способом (Schultz et al., 2013). Бета-разнообразие вычислялось по коэффициенту сходства Брэя-Кёртиса (Schultz et al., 2013). Матрица дистанций для всех проб строилась с использованием QIIME. 3D и 2D схемы построены инструментом EMPeror (Vázquez-Baeza et al., 2013) и с помощью программного пакета STATISTICA, версия 9 (StatSoft Inc., США). С помощью STATISTICA также выполняли анализ многомерного распределения (MDS) и проводили дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим вычислением наименьшего значимого различия Фишера (post hoc LSD). Для выполнения анализа сходства групп в многомерном распределении (ANOSIM) и анализа относительного (процентного) вклада переменных в многомерное распределение (SIMPER) был использован программный пакет Community Analysis Package, версия 5.2.1.448 (Pisces Conservation Ltd, Великобритания).

### 2.3.9 Определение численности бактериопланктона Енисея

На борту судна отбирали по 4,8 мл воды, помещали в стерильные пенициллиновые флаконы, добавляли по 200 мкл 50% глутаральдегида, и хранили при температуре 4С. В лаборатории 0,5 мл пробы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид). После окрашивания пробы фильтровали на ядерные мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия), предварительно окрашенные Суданом чёрным В. Такой же метод окрашивания и подсчёта бактериопланктона применялся и в других исследованиях р. Енисей (Meon, Amon, 2004; Korylov et al., 2012). Клетки фотографировали при помощи системы фотодокументации микроскопа Axioscope 40

(Zeiss, Германия), в режиме эпифлуоресценции. Для подсчёта численности клеток в поле кадра, каждый снимок обрабатывался в программе ImageJ v. 1.44 p (Wayne Rasband National Institutes of Health, США, <http://imagej.nih.gov/ij>). Для определения численности бактериопланктона всем фильтре, среднее число клеток в кадре умножали на коэффициент, связывающий площадь кадра с общей площадью фильтра.

### 2.3.10 Анализ изменений в составе бактериопланктона в МЭС методом денатурирующего градиентного гель-электрофореза

Изменения в структуре сообщества бактериопланктона в экспериментальных и контрольных микроэкосистемах отслеживались с помощью ДГГЭ и секвенирования фрагментов гена 16S рРНК, как и в работах других авторов (Lebaron et al., 2001; Lindh et al., 2013; Øvreås et al., 2003; Schäfer et al., 2001). ДГГЭ выполняли на приборе DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, США) в 6% полиакриламидном геле с градиентом денатурирующего фактора от 25% до 70% (100% денатурирующий фактор представляет собой смесь 7М раствора мочевины и 40% деионизованного формамида). Электрофорез вели при 60°C в однократном ТАЕ буфере при напряжении 50В 30 минут, и затем 100 В в течение 16 часов 45 минут. По окончании электрофореза гель окрашивали бромистым этидием или красителем Gel Green (Biotium, США) и получали цифровые изображения в УФ (302 нм) свете на приборе AlphaImager (Alpha Innotech Corp., США). Полосы геля с ДНК, соответствующей субдоминантным видам бактерий, потребляющих добавленные аминокислоты, вырезали стерильным скальпелем.

Оцифрованные фотографии геля подвергали денситометрическому анализу при помощи вкладки 1D-Multi программы AlphaEase v5.5 (Alpha Innotech Corp., USA). ДГГЭ гели состоят из нескольких дорожек, соответствующих пробам, и на каждой дорожке находится некоторое количество полос различной плотности (яркости) на различных позициях. Программа AlphaEase осуществляет анализ

плотности вдоль полосы, детектируя полосы и вычисляя относительную плотность каждой полосы относительно суммарной плотности всех полос дорожки. Затем определяются полосы, занимающие одну и ту же позицию на различных дорожках. Создаётся матрица для всех дорожек, учитывающая присутствие или отсутствие отдельных полос, и относительный вклад полосы в суммарную плотность дорожки. Порог чувствительности для детекции популяции в сообществе методом ПЦР-ДГГЭ около 1% (Schäfer et al., 2001).

Чтобы получить оценку разнообразия бактериального сообщества, мы вычислили широко используемый индекс Шеннона  $H = -\sum p_i (\log_2 p_i)$ , где  $p_i$  – относительная плотность  $i_{\text{мой}}$  полосы в образце (Dunbar et al., 1999). Кластерный анализ по методу одного звена провели согласно (Jeffers, 1978) с использованием эвклидовых расстояний. Все вычисления выполняли с помощью программы STATISTICA, версия 9 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

### 2.3.11 Клонирование генов 16S рРНК бактериоплактона из экспериментов в МЭС

#### 2.3.11.1 I эксперимент

Фрагменты гена 16S рРНК, вырезанные из геля, элюировали в ПЦР-буфер, как описано в (Frost, Guggenheim, 1999), и реамплифицировали с теми же праймерами без GC-clamp.

Для клонирования ПЦР-продуктов готовили Т-вектор. Для этого плазмиду рBluescript II (Stratagene, США) обрабатывали рестриктазой EcoR V (СибЭнзим, Новосибирск), достраивали «липкие» 3'-Т-концы двухчасовым инкубированием при 72°C с Taq ДНК полимеразой и dTTP. Полученный Т-вектор очищали препаративным электрофорезом в 0,8% агарозном геле и выделяли из геля с помощью набора MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия).

Фрагменты гена 16S рРНК бактерий и Т-вектор лигировали высокоактивной Т4 ДНК лигазой (СибЭнзим, Новосибирск) при 16°C. Лигазной смесью трансформировали клетки E. coli XL-1 Blue (Stratagene, США). Компетентные клетки E.

*coli* готовили стандартным методом, используя TFB буфер, как описано у Сэм-брука и др. (Sambrook et al., 1989). Клеточную суспензию высевали на 1,5% LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина, 80 мкг/мл X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид) и 80 мкг/мл ИПТГ (изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид). Отбор клонов, содержащих вставку, проводили методом «бело-голубого» скрининга (Sambrook et al., 1989). Белые колонии переносили в микропробирки, содержащие 20 мкл 10 mM Трис-HCl, pH 8,0. Для анализа размера вставок проводили ПЦР с 2 мкл суспензии клеток в качестве матрицы, используя праймеры, комплементарные участкам плазмиды в районе вставки (M13-Up 5'-ССТ TTG TCG ATA CTG GTA-3', M13-Down 5'-GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG A-3'). Условия реакции: первый цикл - 94°C, 2 мин; 60°C, 1 мин; 72°C, 1 мин; 29 циклов - 94°C, 30 с; 60°C, 40 с; 72°C, 40 с и окончательная полимеризация 72°C, 5 мин. Полученные продукты реакции анализировали электрофорезом в 1,2% агарозном геле. После окрашивания геля бромистым этидием полосы искомого размера (1124 п.н.) вырезали из геля под длинноволновым УФ и выделяли ДНК как описано выше.

#### 2.3.11.2 IV эксперимент

ДНК, вырезанную из денатурирующего полиакриламидного геля, элюировали в 2-кратный ПЦР-буфер и реамплифицировали праймерами 341F-907R (не содержащими GC-clamp). Продукты реамплификации выделяли препаративным электрофорезом в 1,5% геле агарозы и последующей очисткой вырезанных из геля фрагментов с помощью набора illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) по протоколу, рекомендованному производителем. Очищенные фрагменты ДНК клонировали в вектор pJET1.2 с помощью набора CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) по протоколу, рекомендованному производителем. Трансформацию бактерий *E.coli* XL-1 Blue (Stratagene, США) осуществляли с помощью набора TransformAid Bacterial Trans-

formation Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) по протоколу, рекомендованному производителем. Трансформированные бактерии высевали на 1,5% LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина. По заявлению производителя, после трансформации на среде вырастают только колонии, содержащие клонированный фрагмент, поскольку рециркуляризованная плаزمида pJET1.2 без вставки экспрессирует летальный для клетки белок. Отбор колоний, содержащих вставку нужного размера (586 п.н.), проводили методом ПЦР колоний. Для этого готовили смесь для ПЦР с праймерами, комплементарными участкам плазмиды в районе вставки (pJET1.2 forward sequencing primer 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC, pJET1.2 reverse sequencing primer 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG). Стерильной микробиологической петлей касались колонии и ресуспендировали клетки в 20 мкл ПЦР-смеси. Условия реакции: первый цикл - 95°C, 3 мин; 24 цикла - 94°C, 30 с; 60°C, 30 с; 72°C, 45 с. Полученные продукты реакции анализировали электрофорезом в 1,2% агарозном геле. Колонии, содержащие плазмиду со вставкой искомого размера, пересеивали в жидкую LB-среду с ампициллином на ночь при 37°C с перемешиванием. Плазмиды из клеточной биомассы выделяли набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

### 2.3.12 Определение нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК бактериоплактона из экспериментов в МЭС

#### 2.3.12.1 I эксперимент

Нуклеотидные последовательности полученных вставок определяли на автоматическом секвенаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech, США) Центра коллективного пользования приборами НОЦ "Енисей" (СФУ, Красноярск) с помощью набора Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech, США) согласно рекомендациям производителя. Для секвенирования применяли универсальные плазмидные праймеры M13. Полученные нуклео-



тидные последовательности генов 16S рРНК были депонированы в базе данных GenBank под номерами HM072086 и HM072087, а также в базе EMBL под номерами FN773496-FN773499.

#### 2.3.12.2 IV эксперимент

Нуклеотидную последовательность вставок в полученных плаزمиде определяли секвенированием с использованием флуоресцентно меченного праймера на автоматическом секвенаторе NEN Model 4300L DNA Analyzer (LI-COR, USA). Реакцию секвенирования проводили с 2 пмолями праймера IRDye800 labeled T7 Promoter (5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАGGG), комплементарного участку плазмиды в районе вставки, и 500 нг плазмидной ДНК, с использованием набора USB Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, USA) по протоколу, рекомендованному LI-COR. Разделение продуктов реакции проводили на пластине геля полиакриламида (соотношение акриламид:бис-акриламид 29:1 в концентрации 5,5%, концентрация мочевины 7М) длиной 41 см, толщиной 0,2 мм в условиях, рекомендованных производителем.

#### 2.3.13 Филогенетический анализ бактериопланктона из экспериментов в МЭС

Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК сравнивали с последовательностями 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/>). Использовались методы присоединения ближайших соседей и максимального правдоподобия с 1000 повторов бутстреп-анализа. В качестве внешнего (корневого) вида была выбрана архея *Halobacterium* sp.

## ГЛАВА 3 БИОРАЗНООБРАЗИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА Р. ЕНИСЕЙ

### 3.1 Численность

Численность планктонных бактерий на нижних трансектах 9 и 10 составляла  $9,7$  и  $5,6 \cdot 10^6$  кл/мл и соответствовала величинам, опубликованным в работе (Korylov et al., 2012), хотя другие авторы приводят меньшие значения  $\approx 1,5 \cdot 10^6$  кл/мл (Meon, Amon, 2004) или около  $2-4 \cdot 10^6$  кл/мл (Aronasenko et al., 2010). В целом численность бактериопланктона сравнительно мало варьировала на всём протяжении изученного нами среднего и нижнего Енисея (рисунок 3.1) и была близка к значениям, характерным для других рек (Ellis et al., 2012; Vargas et al., 2013)

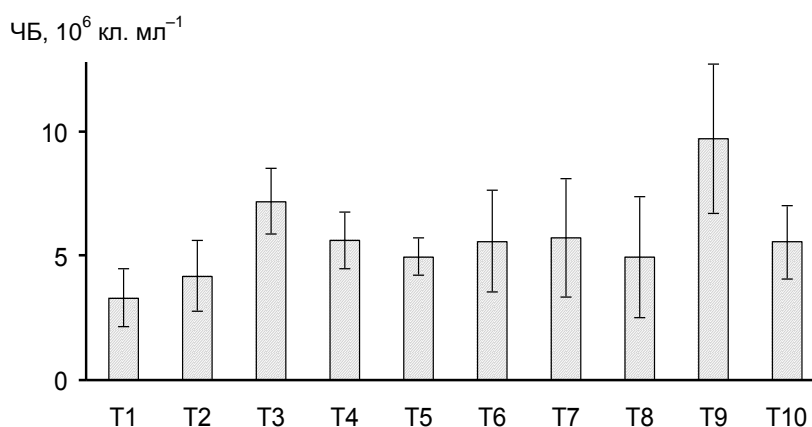


Рисунок 3.1 – Численность планктонных бактерий (ЧБ) в Енисее. T1 – T10 – номера трансект (см. рисунок 2.1)

### 3.2 Альфа-разнообразие (видовое богатство)

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). Из 3022 ОТЕ (т.е. генетических эквивалентов видов бактерий) прокариот 2 принадлежали к археям, остальные – к бактериям (таблица 3.1). Пара праймеров, выбранных нами для создания библиотеки ампликонов, направлена на амплификацию генов 16S рРНК именно бактерий, и позволяет идентифицировать их до рода (Klindworth et al., 2013), поэтому обнаруженные археи - случайность. Бактериальные ОТЕ 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. Сравнительно большое число уникальных операционных таксономических единиц принадлежало к Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes и Verrucomicrobia. Информация о последовательностях гена 16S рРНК бактериопланктона р. Енисей депонирована в базе данных The Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, номер доступа SRP036054).

На всех участках отбора проб по относительной численности доминировали Actinobacteria и Proteobacteria (рисунок 3.2). На трансектах 1 и 2 также были относительно многочисленными представители Firmicutes, а на трансектах с 3 по 5 - Bacteroidetes и Cyanobacteria. По результатам post-hoc теста наименьшего значимого различия Фишера (LSD) средний процент Firmicutes на трансектах 1-2 ( $6,3 \pm 0,9\%$ ) был значительно выше, чем на трансектах 3-5 ( $1,2 \pm 0,2\%$ ,  $p = 0,0000$ ) и 6-10 ( $0,8 \pm 0,1\%$ ,  $p = 0,0000$ ). В свою очередь, средний процент Cyanobacteria на трансектах 3-5 ( $5,1 \pm 0,9\%$ ), был достоверно выше (LSD-тест), чем на трансектах 1-2 ( $1,3 \pm 0,4\%$ ,  $p = 0,0001$ ) и 6-10 ( $1,1 \pm 0,2\%$ ,  $p = 0,0000$ ). Средний процент Verrucomicrobia уменьшился с  $6,9 \pm 1,2\%$  на трансектах 1-2 до  $4,6 \pm 0,6\%$  на трансектах 3-5 и до  $2,7 \pm 0,3\%$  на трансектах 6-10 (все различия значимы согласно LSD-тесту,  $p = 0,0180$ ,  $p = 0,0000$  и  $p = 0,0195$ , соответственно).

Таблица 3.1 – Список групп прокариот – бактерий и архей (Euryarchaeota), число их операционных таксономических единиц (ОТЕ) и прочтений (сиквенсов) в пробах из р. Енисей в июне 2012 г.

No	Таксономическая группа (Phylum)	Число ОТЕ	Число прочтений
1	Proteobacteria	914	84152
2	Actinobacteria	837	109953
3	Unknown bacteria	552	9579
4	Bacteroidetes	200	9313
5	Verrucomicrobia	162	10029
6	Firmicutes	60	4869
7	Planctomycetes	58	4835
8	TM7 genera incertae sedis	58	553
9	Cyanobacteria	55	5520
10	Acidobacteria	37	373
11	Chlamydiae	32	286
12	OD1 genera incertae sedis	13	456
13	Armatimonadetes	9	171
14	Chloroflexi	7	32
15	Gemmatimonadetes	7	173
16	SR1 genera incertae sedis	5	42
17	Deinococcus-Thermus	4	64
18	Fusobacteria	4	48
19	OP11 genera incertae sedis	4	27
20	Euryarchaeota	2	10
21	Chlorobi	1	6
22	Nitrospirae	1	9
	<b>Всего</b>	<b>3022</b>	<b>240500</b>

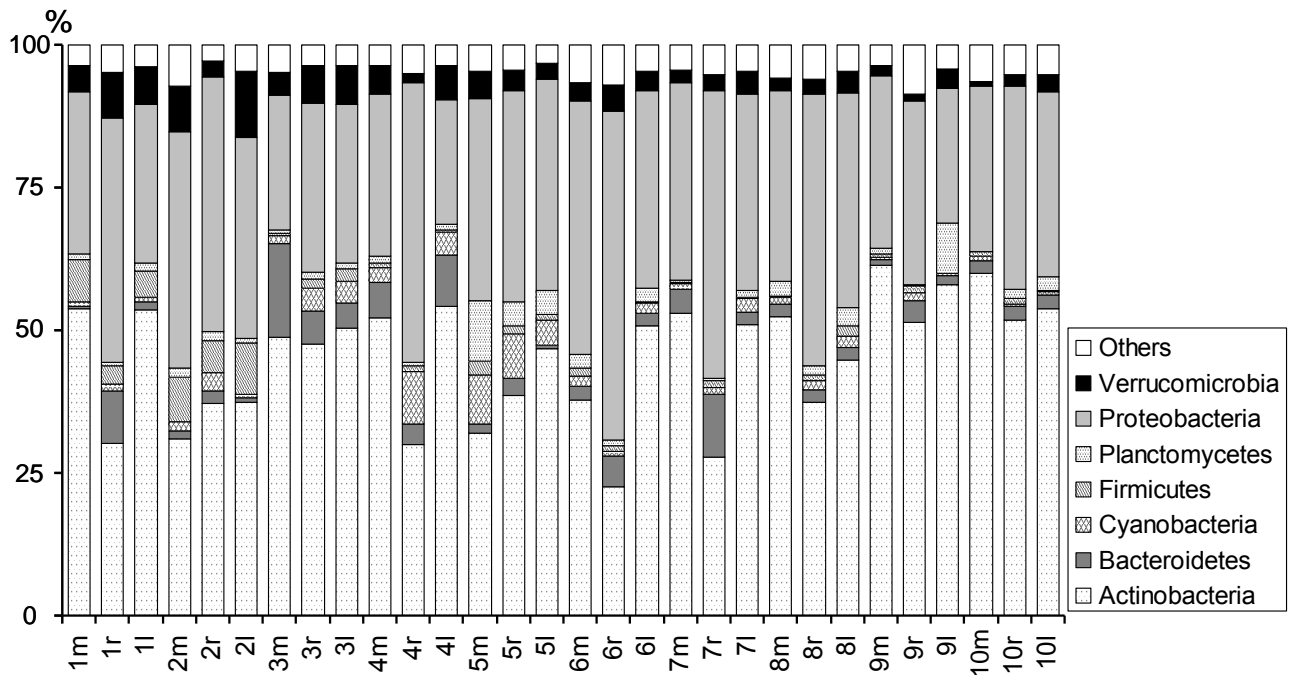


Рисунок 3.2 – Процентные соотношения наиболее многочисленных таксономических групп бактерий в р. Енисей, июнь 2012 г. Аббревиатуры мест отбора проб: см. рисунок 2.1 для обозначения номеров трансект, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег

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 (рисунок 3.3). Это означает, что на упомянутых выше станциях число видов бактерий было наименьшим, и их распределение по численности было наименее равномерным (Gotelli, Colwell, 2011). С другой стороны, кривые разрежения для станций 6m и 6r (ниже Нижней Тунгуски, центр течения и правый берег) возрастали быстрее всех остальных (рисунок 3.3), то есть, на этих станциях было больше видов бактерий в сообществах, и здесь отмечалось более равномерное распределение численности видов, чем на других станциях. Действительно, на станциях 2l и 4r отмечены самые низкие, а на станциях 6m и 6r самые высокие значения индекса разнообразия Шеннона (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Число операционных таксономических единиц (ОТЕ) и значения индекса Шеннона (H) бактериальных сообществ из р. Енисей, июнь 2012 г. Аббревиатуры мест отбора проб: см. рисунок 2.1 для обозначения номеров проб, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег

Проба	Число прочтений	ОТЕ	H
1m	7780	776	7,18
1r	5698	767	7,55
1l	9708	923	7,43
2m	8052	968	7,82
2r	8967	908	7,51
2l	8673	692	6,89
3m	9494	1000	7,91
3r	8166	1016	7,92
3l	8161	930	7,92
4m	9859	1146	8,04
4r	5690	600	7,07
4l	8819	1009	7,93
5m	8579	939	7,48
5r	6824	892	7,66
5l	8409	927	7,66
6m	8159	1192	8,25
6r	8455	1115	8,17
6l	10410	1101	7,89
7m	9766	1052	7,65
7r	7991	964	7,85
7l	7954	1020	7,87
8m	7914	963	7,65
8r	4466	795	7,86
8l	5066	878	7,91
9m	8213	877	7,44
9r	8256	778	7,16
9l	7631	913	7,66
10m	7321	822	7,46
10r	8141	909	7,57
10l	7578	896	7,68

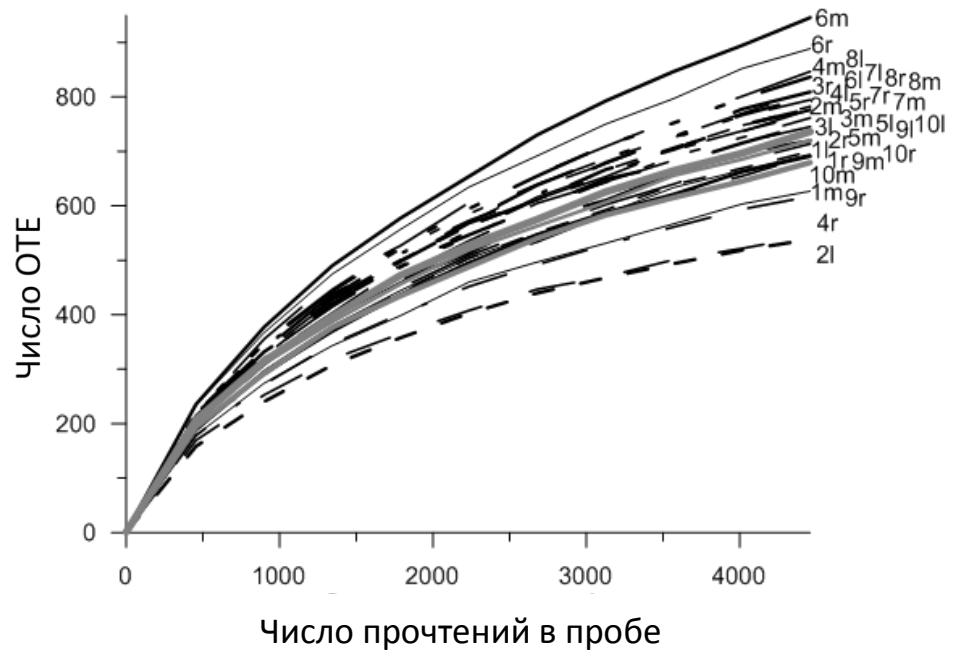


Рисунок 3.3 – Кривые насыщения (rarefaction curves) видового богатства бактериопланктона в р. Енисей. Аббревиатуры мест отбора проб: см. рис. 2.1 для обозначения номеров проб, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег; ОТЕ – операционная таксономическая единица

Реки являются системами с однонаправленным потоком, где по мере продвижения от истока к устью накапливается всё больше биогенных веществ, вымываемых из окружающих почв. 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. Напротив, были обнаружены наивысшие значения альфа-разнообразия примерно в середине изучаемого участка реки, на трансекте 6 (участки отбора проб около правого берега и по центру течения). Температура воды в р. Енисей также имела наивысшие значения в середине изученного участка – около 20°C. Между тем, самая верхняя из изученных трансект – 1, и самые нижние трансекты 9 и 10 имели почти одинаковые значения индикаторов биоразнообразия.

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. После впадения притока, речные воды текут несколько километров практически не смешиваясь, и это хорошо заметно невооружённым глазом, так как воды различаются по цвету и прозрачности. Енисей находится на границе раздела экорегионов: слева находится Западно-Сибирская тайга и в нижнем течении Ямало-Гыданская тундра, справа Восточно-Сибирская тайга и в нижнем течении Таймырская Центральносибирская тундра (Olson et al., 2001). В ходе работы было обнаружено, что самый высокий процент цианобактерий наблюдается в средней части р. Енисей. В верхней части изученного участка реки фотосинтез фитопланктона, в частности, цианобактерий, вероятно, подавляется слишком высокой скоростью потока и сопутствующей турбулентностью. В нижней части течения фитопланктон может быть ингибирован низкой прозрачностью воды.

### 3.3. Бета-разнообразие

Коэффициенты подобия Брея–Кёртиса, являющиеся общепринятой количественной мерой бета-разнообразия (т.е., сходства видового состава сообществ) приведены в таблице 3.3. В целом, сходство между станциями отбора снижалось вниз по течению реки от трансекты 1 к трансекте 10. Результаты многомерного анализа степени сходства (MDS) между пробами приведены на рисунке 3.4. В координатах двух первых осей с наибольшим значимым вкладом чётко выделяются три кластера: пробы с трансект 1-2, трансект 3-5 и трансект 6-10 (рисунок 3.4). 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).

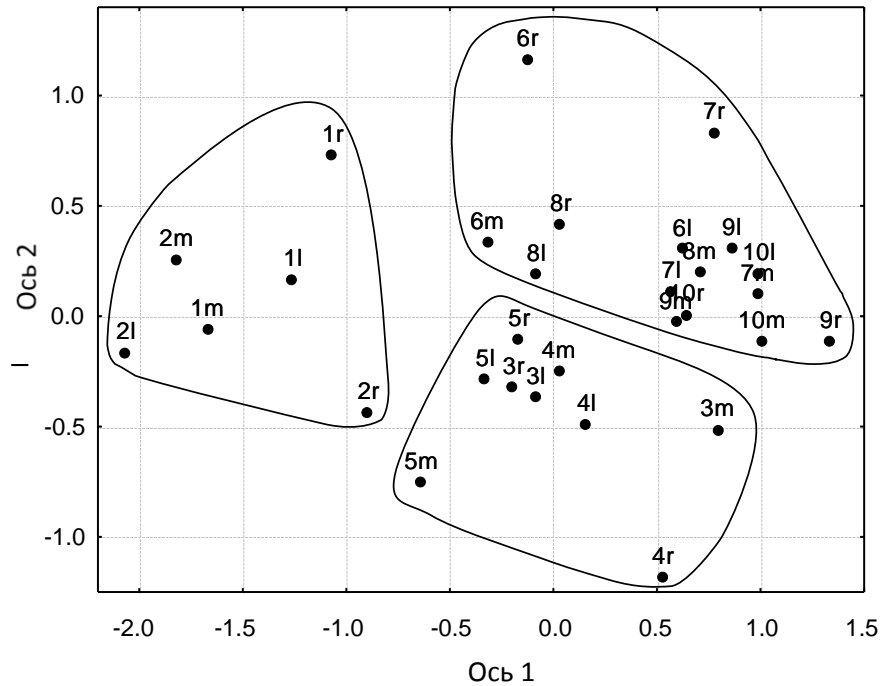


Рисунок 3.4 – Результаты многомерного анализа степени сходства (MDS) между пробами бактериальных сообществ р. Енисей, основанные на коэффициентах подобия Брея-Кёртиса, вычисленных по относительной численности операционных таксономических единиц (ОТЕ). Аббревиатуры мест отбора проб: см. рисунок 2.1 для обозначения номеров проб, m – основное течение реки, r – правый берег, l – левый берег

Десять ОТЕ из каждого участка с наивысшей средней относительной численностью (%) перечислены в таблице 3.4. Так как три списка частично перекрываются, в таблице 3.4 представлены только 20 ОТЕ.

На участках I и II доминировали бактерии ОТЕ 1297 *Ilumatobacter*, которые также являлись субдоминантами на участке III. Данный вид (ОТЕ), согласно многомерному статистическому тесту относительного сходства SIMPER вносил наивысший вклад в различия видового состава сообществ трёх участков реки (таблица 3.4). Видовой состав участка I характеризовался более высокой относительной

численностью ОТЕ 8 Microbacteriaceae, ОТЕ 13 *Rhizobium*, ОТЕ 15 *Rhodobacter*, ОТЕ 25 *Arthrobacter*, ОТЕ 4 Actinomycetales, ОТЕ 47 Microbacteriaceae, ОТЕ 12 Actinobacteria и ОТЕ 16 Sphingomonadaceae, но значительно меньшей относительной численностью ОТЕ 671 *Ilumatobacter*, чем на участках II и III (таблица 3.4). Участок II характеризовался наибольшей относительной численностью ОТЕ 18 Chitinophagaceae и ОТЕ 21 *GpIIa* по сравнению с участками I и III (таблица 3.4). Участок III отличался высокой долей ОТЕ 2179 Actinomycetales (доминирующий вид данного участка), ОТЕ 2 Rhizobiales, ОТЕ 2588 Actinomycetales, ОТЕ 5 *Polynucleobacter* и ОТЕ 17 *Acinetobacter* (таблица 3.4).

Таким образом, в соответствии с нашими данными по бета-разнообразию бактериальных сообществ, проанализированными с помощью MDS и ANOSIM, экосистема изученного отрезка реки Енисей может быть подразделена на три участка: верхний (участок I), средний (участок II) и нижний (участок III). Верхний участок реки (трансекты 1-2) расположен в горах Енисейского кряжа в районе впадения р. Ангары. Бактериальные сообщества этого участка характеризовались высокой относительной численностью Firmicutes и Verrucomicrobia по сравнению с другими участками. Тем не менее, доминантные ОТЕ на этом участке принадлежали к типам Actinobacteria и Proteobacteria. 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 р. *Rhodobacter* в литературе отмечено увеличение численности в речных биоплёнках после добавления пестицидов (Tien et al., 2013). Упомянутые литературные сведения, возможно, объясняют преобладание ОТЕ 15 *Rhodobacter* на участке I, для которого характерно галечное дно, покрытое биоплёнками, и некоторое антропогенное загрязнение (Gladyshev et al., 2012), предположительно превышающее таковое на значительно менее населённых участках II и III. Ещё один доминант первого участка, бактерии *Arthrobacter*, по ли-

тературным данным осуществляет в реках деградацию ароматических загрязняющих веществ (Narancic et al., 2012). Ранее в именно в данном «горном» участке р. Енисей была обнаружена высокая активность фенол-деградирующих бактерий (Gladyshev et al., 1993). Возможно, доминирование вида ОТЕ 25 *Arthrobacter* на участке I, обнаруженное в ходе нашего исследования, объясняется его способностью к деградации фенольных загрязнений, характерных для данного участка реки. Интересно заметить, что разные ОТЕ одного рода *Flumetobacter* имели разные распределения между участками реки: ОТЕ 1297 была доминантной бактерией на участке I и имела наибольший процент среди всех ОТЕ, в то время как ОТЕ 671 имела значительно меньшую относительную численность на участке I по сравнению с участками II и III. Очевидно, что два разных вида (штамма) этого рода имели различные экологические свойства.

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*.

Нижний участок III (трансекты 6-10) был отделён от среднего притоком р. Нижняя Тунгуска. Ниже места впадения Нижней Тунгуски цвет воды в р. Енисей значительно изменился от прозрачного до коричневого, вероятно из-за высоких концентраций гуминовых кислот, стекающих с окружающих почв (Gladyshev et al., 1993). Таким образом, ниже притока р. Нижней Тунгуски (рисунок 2.1), содержание общего органического углерода в Енисее увеличилось с ~7 мг/л до ~12 мг/л (Gladyshev et al., 1993). Доминантным индикаторным таксоном участка III была ОТЕ 5 *Polynucleobacter*. Это хорошо известный распространённый космополитный род, изолированный из лотических и лентических экосистем по всему миру (Ghai et al., 2011). Некоторые виды рода *Polynucleobacter* были особенно многочисленны в водах с высоким содержанием аллохтонного растворённого органического вещества, включая гуминовые кислоты (Watanabe et al., 2012). Как отмечалось выше, для нижнего течения р. Енисей характерны высокие концентрации

растворённого органического вещества, включая аллохтонные гуминовые вещества (Gladyshev et al., 1993), и это может служить объяснением преобладания *Polynucleobacter* на участке III. Другим индикаторным таксоном участка III была ОТЕ 17 *Acinetobacter*. Некоторые виды рода *Acinetobacter* являются копитрофными 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 совершенно 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.

Таблица 3.3 – Коэффициенты подобия Брея-Кёртиса бета-разнообразия бактериопланктона в р. Енисей в июне 2012 г.

	1m	1r	1l	2m	2r	2l	3m	3r	3l	4m	4r	4l	5m	5r	5l	6m	6r	6l	7m	7r	7l	8m	8r	8l	9m	9r	9l	10m	10r	
1r	0,46	1,00																												
1l	0,70	0,56	1,00																											
2m	0,47	0,40	0,44	1,00																										
2r	0,42	0,40	0,45	0,53	1,00																									
2l	0,51	0,42	0,49	0,58	0,47	1,00																								
3m	0,24	0,40	0,33	0,21	0,34	0,20	1,00																							
3r	0,39	0,44	0,47	0,41	0,55	0,38	0,53	1,00																						
3l	0,40	0,44	0,47	0,36	0,51	0,35	0,55	0,69	1,00																					
4m	0,38	0,43	0,47	0,35	0,48	0,33	0,59	0,71	0,69	1,00																				
4r	0,23	0,33	0,28	0,24	0,36	0,18	0,42	0,44	0,47	0,44	1,00																			
4l	0,33	0,40	0,42	0,32	0,43	0,30	0,63	0,65	0,67	0,70	0,45	1,00																		
5m	0,36	0,32	0,37	0,41	0,47	0,34	0,31	0,53	0,46	0,50	0,30	0,44	1,00																	
5r	0,36	0,38	0,41	0,36	0,49	0,31	0,44	0,60	0,56	0,60	0,44	0,54	0,64	1,00																
5l	0,33	0,31	0,37	0,39	0,55	0,35	0,40	0,57	0,54	0,56	0,36	0,51	0,55	0,59	1,00															
6m	0,41	0,39	0,41	0,44	0,49	0,34	0,38	0,53	0,52	0,52	0,38	0,46	0,54	0,59	0,55	1,00														
6r	0,31	0,34	0,32	0,40	0,40	0,27	0,32	0,38	0,40	0,36	0,46	0,32	0,33	0,42	0,36	0,55	1,00													
6l	0,27	0,33	0,32	0,22	0,35	0,19	0,50	0,49	0,50	0,54	0,42	0,50	0,39	0,50	0,51	0,48	0,39	1,00												
7m	0,23	0,33	0,29	0,21	0,31	0,17	0,55	0,45	0,47	0,48	0,43	0,49	0,30	0,43	0,39	0,43	0,40	0,60	1,00											
7r	0,22	0,34	0,26	0,23	0,31	0,18	0,51	0,40	0,42	0,42	0,49	0,41	0,29	0,41	0,35	0,45	0,52	0,51	0,55	1,00										
7l	0,28	0,35	0,33	0,25	0,36	0,22	0,54	0,51	0,51	0,54	0,39	0,53	0,41	0,53	0,52	0,50	0,39	0,65	0,65	0,52	1,00									
8m	0,25	0,32	0,31	0,22	0,35	0,18	0,53	0,48	0,50	0,52	0,47	0,50	0,37	0,50	0,45	0,51	0,44	0,67	0,69	0,55	0,66	1,00								
8r	0,36	0,36	0,39	0,36	0,45	0,29	0,41	0,52	0,52	0,51	0,45	0,47	0,47	0,56	0,53	0,61	0,56	0,55	0,49	0,51	0,55	0,58	1,00							
8l	0,36	0,36	0,41	0,38	0,44	0,31	0,41	0,54	0,51	0,56	0,33	0,50	0,55	0,59	0,59	0,59	0,42	0,53	0,45	0,43	0,59	0,50	0,62	1,00						
9m	0,33	0,35	0,40	0,25	0,37	0,24	0,53	0,49	0,49	0,54	0,37	0,51	0,41	0,52	0,49	0,47	0,36	0,58	0,61	0,46	0,65	0,62	0,53	0,56	1,00					
9r	0,21	0,31	0,28	0,21	0,29	0,21	0,50	0,38	0,38	0,42	0,33	0,44	0,28	0,39	0,34	0,35	0,32	0,43	0,61	0,45	0,53	0,52	0,39	0,40	0,59	1,00				
9l	0,27	0,27	0,33	0,18	0,31	0,17	0,48	0,44	0,45	0,50	0,32	0,48	0,38	0,46	0,48	0,44	0,31	0,65	0,58	0,43	0,63	0,63	0,49	0,52	0,62	0,44	1,00			
10m	0,25	0,34	0,32	0,23	0,32	0,21	0,53	0,43	0,44	0,47	0,36	0,48	0,33	0,44	0,40	0,40	0,34	0,50	0,61	0,47	0,58	0,58	0,46	0,46	0,68	0,70	0,52	1,00		
10r	0,28	0,34	0,35	0,27	0,38	0,25	0,52	0,50	0,48	0,53	0,33	0,50	0,43	0,53	0,50	0,47	0,36	0,56	0,58	0,49	0,64	0,60	0,54	0,58	0,71	0,60	0,61	0,67	1,00	
10l	0,23	0,29	0,28	0,17	0,31	0,14	0,51	0,43	0,46	0,48	0,42	0,48	0,30	0,42	0,42	0,41	0,36	0,64	0,66	0,51	0,64	0,67	0,48	0,45	0,62	0,52	0,65	0,60	0,61	

Таблица 3.4 – Средние значения ( $\pm$  стандартные ошибки) относительной численности наиболее многочисленных (по де-сять из каждого участка) операционных таксономических единиц (ОТЕ) на трёх участках р. Енисей в июне 2012 г.: участ-ок I (трансекты 1-2), участок II (трансекты 3-5) и участок III (трансекты 6-10). Dis – вклад (%) в средние различия ме-жду 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 наимень-шего значимого различия (LSD) для однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. При недостоверном ANOVA бу-квенные 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	Cyanobacteria		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

### 3.4 Сравнение с другими реками

Наши данные по биоразнообразию бактериопланктона р. Енисей можно сравнить с немногочисленными данными по видовому составу бактерий, полученными с помощью секвенирования нового поколения в других реках, хотя в них пробы отбирались только в одной точке или на относительно коротком участке. В р. Амазонка наиболее часто обнаруживаемые последовательности гена 16S рРНК принадлежали бактериям типов Actinobacteria и Proteobacteria (Ghai et al., 2011), так же как и в Енисее. Метагеномный анализ Амазонки показал наличие в сообществе многочисленных генов ферментов, необходимых для разложения различных источников углерода, включая ароматические соединения и аминокислоты. Это согласуется с полученным в работе (Колмакова, Трусова, 2011) результатом, свидетельствующим, что аминокислоты в основном потребляются именно представителями Proteobacteria. Данный результат будет более подробно представлен ниже в разделе 4.1.

В р. Колумбия наибольшую долю бактериального сообщества составляли представители типа Proteobacteria, в то время как бактерии типов Bacteroidetes и Actinobacteria имели значительно меньшую относительную численность (Fortunato et al., 2012). Стоит заметить, что в р. Колумбия неизвестные бактерии составляют около 12% (исходя из данных таблицы S2 в Fortunato et al., 2012), а в Енисее доля неизвестных бактерий была около 18% всех ОТЕ (таблица 3.1).

В р. Миссисипи также доминировал тип Proteobacteria, а следующим по численности представителей был тип Actinobacteria (Staley et al., 2013). На 10 исследованных станциях, расположенных на участке р. Миссисипи длиной около 400 км, не было обнаружено значительных различий в составе бактериальных сообществ.

В р. Огайо доминировали представители типа Cyanobacteria, а субдоминантами были Actinobacteria и Bacteroidetes (Schultz et al., 2013). Таким образом, в пяти изученных реках доминировали различные типы бактерий: Actinobacteria в р. Амазонка и в р. Енисей, Proteobacteria в р. Колумбия и р. Миссисипи, и Cyanobacteria в р. Огайо. То есть, вывод Гхая (Ghai et al., 2011) о том, что наиболее многочисленными прокариотическими организмами в пресноводных экосистемах являются представители Actinobacteria не нашёл подтверждения в других исследованиях.

### Резюме

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. Особенности видового состава бактерий верхнего (горного) участка реки, вероятно, были обусловлены высокими скоростями течения и галечным дном, что способствовало развитию биоплёнок и доминированию ассоциированного с биоплёнками р. *Rhodobacter*. Кроме того, верхний участок потенциально подвержен антропогенной нагрузке, которая также может обуславливать зарегистрированную нами высокую численность р. *Rhodobacter* и р. *Arthrobacter*, способных к деградации фенольных загрязнений. На среднем участке складываются условия, благоприятные для роста (фотосинтеза) цианобактерий: замедленная скорость течения по сравнению с верхним участком и высокая прозрачность (низкая цветность) воды по сравнению с нижним участком. Высокое содер-



жание растворённого органического углерода (гуминовых веществ) в воде нижнего участка, вероятно, обуславливало доминирование р. *Polynucleobacter* и *Acinetobacter*, преобладающих в речных водах с высокой концентрацией аллохтонных органических веществ.

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.

ГЛАВА 4 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОТРЕБЛЕНИЯ  
АМИНОКИСЛОТ БАКТЕРИОПЛАНКТОНОМ ЭВТРОФНОГО  
ВОДОХРАНИЛИЩА

4.1 Июль 2004 г. (I эксперимент)

На основании анализа ДГГЭ-геля в исходной пробе (рисунок 4.1, T1) выявлено 25 полос гена 16S рРНК, условно соответствующих разным видам бактерий. В контрольной МЭС в течение всего эксперимента не происходило существенных качественных и количественных изменений состава бактериопланктона по сравнению с исходной пробой. Данный результат означает, что в контрольной МЭС в течение всего эксперимента функционировало естественное сообщество бактериопланктона водохранилища.

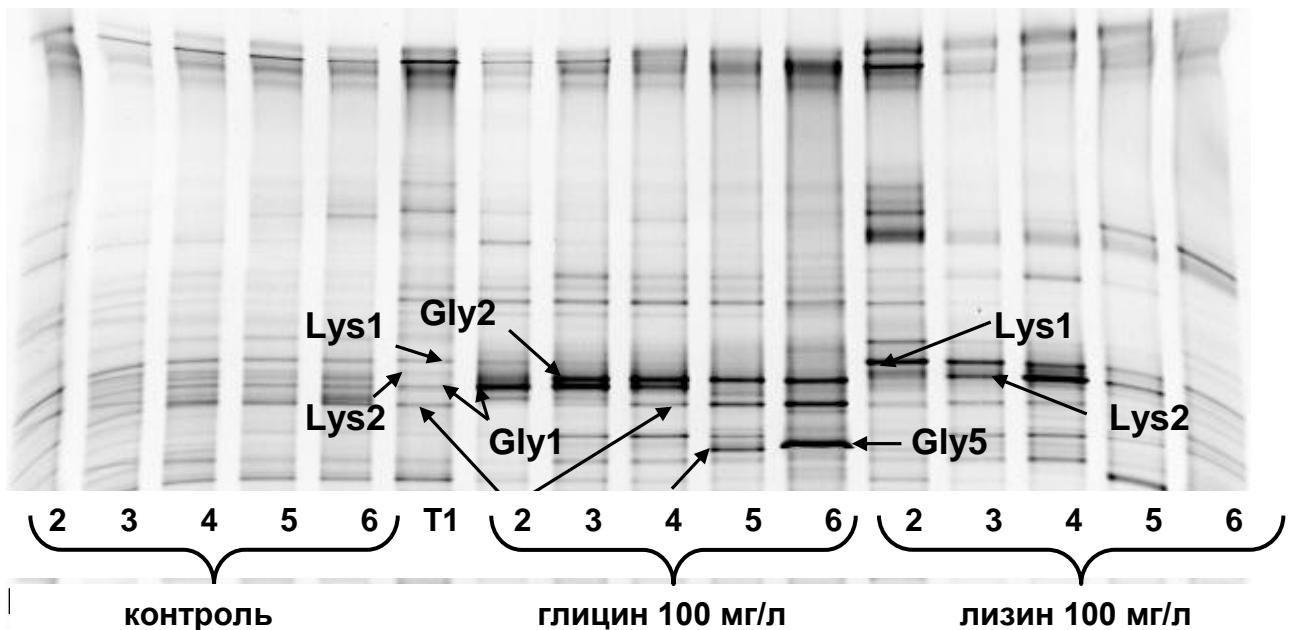


Рисунок 4.1 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона I эксперимента из МЭС с добавками лизина, МЭС с добавкой глицина, контрольной МЭС и исходной пробы (T1). Стрелки указывают на полосы ДНК, нуклеотидная последовательность которых определена

В МЭС с добавкой глицина состав бактериопланктона уже на вторые сутки эксперимента резко отличался от исходной пробы (рисунок 4.1). Полоса *Gly1*, присутствовавшая в исходной пробе, вышла в доминанты по относительной плотности (интенсивности) уже на вторые сутки и продолжала доминировать до четвёртых суток эксперимента. На третьи сутки в МЭС с добавкой глицина появился субдоминант *Gly2*. На четвертые сутки эксперимента профиль существенно не менялся, начала увеличиваться доля полосы *Gly3*. На пятые сутки полоса *Gly1* исчезла из бактериального сообщества МЭС, однако появилась новая доминирующая полоса *Gly4*. В последний день его вытеснила другая новая полоса *Gly5*. В течение третьих – пятых суток в сообществе МЭС с добавкой глицина увеличивалась доля ещё двух полос, однако в доминанты к концу эксперимента они не вышли. Таким образом, в бактериальном сообществе при добавлении глицина произошел рост относительной плотности двух исходно заметных полос с последующим исчезновением одной из них к концу эксперимента и проявление трех не обнаруживаемых в исходной пробе полос.

В МЭС с добавкой лизина на вторые сутки эксперимента одно из доминирующих положений заняла полоса *Lys1*, однако к концу эксперимента её доля уменьшилась (рисунок 4.1). К четвертым суткам в доминанты вышла полоса *Lys2*, но впоследствии она также уступила место двум новым полосам.

Кластерный анализ, основанный на присутствии полос и их относительной интенсивности, дал четыре основных кластера (рисунок 4.2). Первый кластер содержал все пробы из контрольной МЭС, исходную пробу (Т1) и пробу из МЭС с добавкой лизина на вторые сутки культивирования (Л2). Кластеризация исходной пробы с образцами из контрольной МЭС подтверждает, что бактериопланктонное сообщество в контрольной МЭС оставалось неизменным в течение всего эксперимента. Проба Л2 кластеризовалась с Т1, а значит, в МЭС с добавкой лизина не произошло значительных изменений

сразу после начала эксперимента. Два следующих кластера содержали пробы, взятые на 3-6 сутки из МЭС с добавкой лизина (Л3-Л6). Наиболее удалённый от других кластер содержал пробы, взятые на 2 – 6 дни из МЭС с добавкой глицина (Г2 – Г6). Индекс разнообразия Шеннона, основанный на числе полос и их относительной плотности, варьировался от 3,7 до 4,54 во всех МЭС, не проявляя значительных трендов в ходе эксперимента.

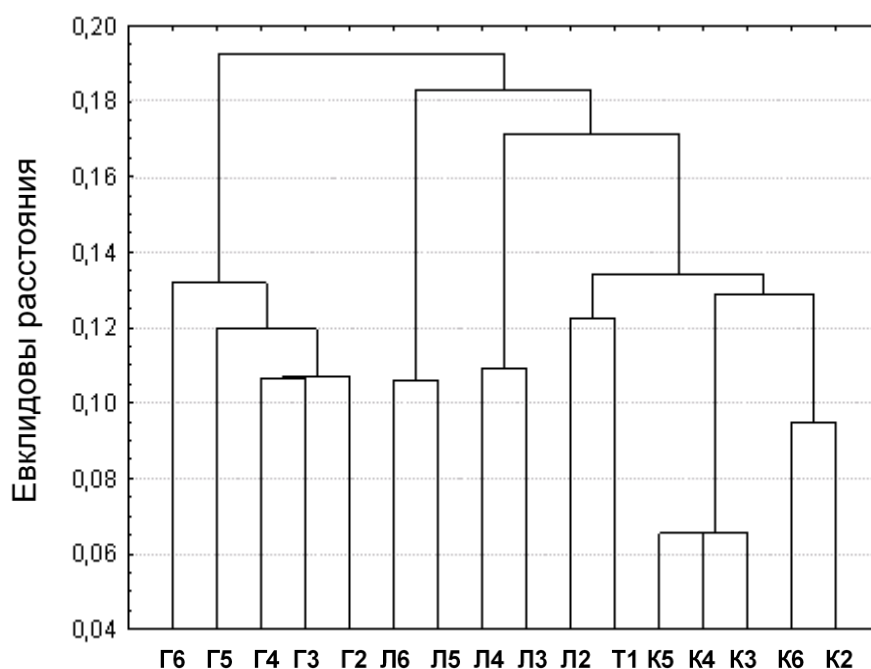


Рисунок 4.2 – Кластеризация проб бактериопланктона из микроэкосистем эксперимента I, в соответствии с данными ДГГЭ. Т1 – исходная проба, К2-К6 – контроль, Г2-Г6 – МЭС с добавкой глицина, Л2-Л6 – МЭС с добавкой лизина. Численное значение в обозначении проб соответствует суткам эксперимента

По результатам филогенетического анализа (рисунок 4.3) бактерии, соответствующие полосам *Lys1* и *Lys2*, доминировавшим в течение первых трех суток в МЭС с добавкой лизина, принадлежали к семейству *Burkholderiaceae* класса *Betaproteobacteria*. Бетапротеобактерии в настоящее время – наиболее исследованная и зачастую самая многочисленная группа бактерий, населяющих верхний слой озёрной воды (Newton et al., 2011).

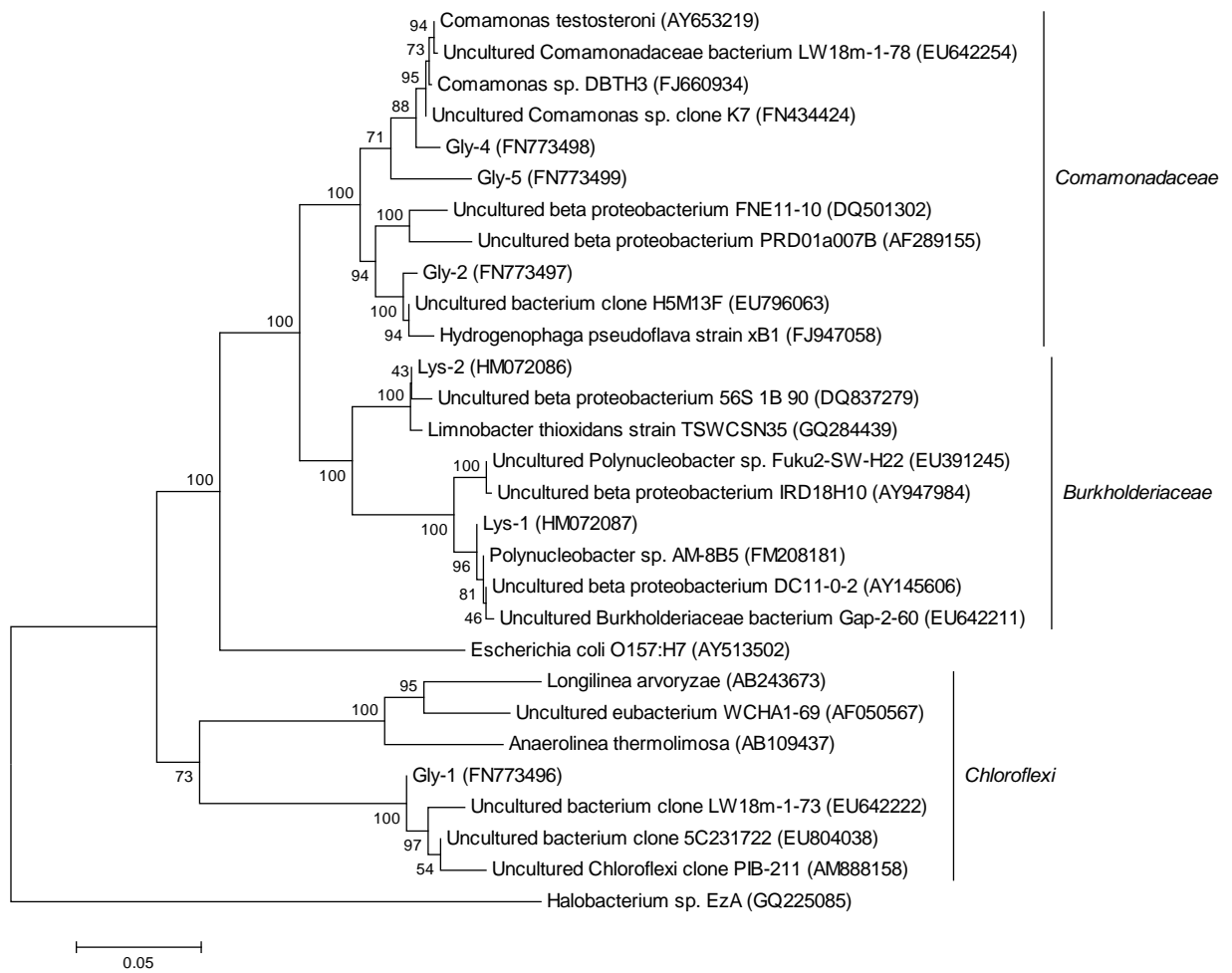


Рисунок 4.3 – Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, соответствующих полосам ДГГЭ из экспериментов с микроэкосистемами. Выборочные последовательности из базы данных GenBank и референсные штаммы включены для сравнения. Значения бутстрэп-анализа указаны на ветвях дерева, построенного методом присоединения ближайших соседей. В скобках указаны номера последовательностей в GenBank. Масштабная линейка представляет 5% дивергенцию

Последовательность нуклеотидов исследованного участка 16S рРНК полосы *Lys1* оказалась на 100% идентична хемоорганогетеротрофной аэробной неподвижной бактерии *Polynucleobacter diffcilis* (Hahn et al., 2012). Этот генотип был также обнаружен в водах армянского озера Севан (Hahn et al., 2012), тибетского озера Келике, озера Мичиган (Mueller-Spitz et al., 2009), и

бухты Чесапик (Shaw et al., 2008). *Lys2* на 99% был идентичен штамму *Limnobacter thiooxidans*, обнаруживаемому в осадочных образцах пресноводного родника. Аналогичные некультивируемые бактерии были обнаружены в пробе аэрозоля с береговой антарктической станции Дюмонт д'Урвилль, на поверхности снежных глыб в Андах на высоте 6350 м, в фьорде Северного Ледовитого океана, над местом выхода метана вдоль края североамериканского континента (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *Limnobacter thiooxidans* потребляет аспарат и глутамат в лабораторных культурах, но потребление других аминокислот изучено не было (Spring et al., 2001). Таким образом, бактерии, увеличение численности которых можно считать следствием добавления лизина, принадлежат к одному и тому же семейству.

Ближайшие родственники бактерий, соответствующих полосам *Gly2*, *Gly4* и *Gly5* из МЭС с добавкой глицина, принадлежали к семейству Comamonadaceae класса Betaproteobacteria. *Gly2* оказался на 99% сходен с некультивируемой бактерией, обнаруженной в сточных водах. *Gly4* имел 98% сходство со штаммами *Comamonas testosteroni*, выделенными из сточных вод фабрики, производящей тетрациклин. По литературным данным, *Comamonas testosteroni* потребляет глицин и некоторые другие аминокислоты (потребление лизина не тестировалось) в лабораторных культурах (Tamaoka et al., 1987). Полоса *Gly5* на филогенетическом древе образовала отдельную ветвь, далеко отстоящую от всех остальных представителей семейства Comamonadaceae (рисунок 4.3). Последовательность нуклеотидов проанализированного участка гена 16S рРНК полосы *Gly5* имела лишь 96% сходство с ближайшими родственниками. Таким образом, согласно общепринятому «правилу 97%» (Giovannoni, Stingl, 2005) *Gly5* является новым, ранее не описанным видом. Полоса *Gly1* имела 100% идентичность анализируемого участка гена 16S рРНК с некультивируемой бактерией, наиболее близкой к пресноводному типу Chloroflexi (рисунок 4.3) (Newton et al., 2011). Некультивируемые бактерии Chloroflexi, включая *Gly1*, образуют отдельный кластер, да-

леко отстоящий от всех известных культивируемых видов этой группы (рисунк 4.3). Данная бактерия обнаружена в воде озёр Китая, Греции, Северной, Центральной и Южной Америки [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. Определить нуклеотидную последовательность исследуемого участка гена 16S рРНК полосы *Gly3* не удалось.

Добавки аминокислот глицин и лизин в природное бактериопланктонное сообщество МЭС в эксперименте I привело к доминированию различных видов бактерий. Это наблюдение означает, что различные аминокислоты потребляются разными таксонами. В настоящее время мало известно о том, специализируются ли отдельные виды бактериопланктона на потреблении конкретных видов растворённого органического углерода (Mou et al., 2008). Предполагается, что некоторые таксоны бактериопланктона могут иметь предпочтение к утилизации конкретных источников углерода, которые доступны в высоких концентрациях (Buck et al., 2009). Наши данные подтверждают это предположение. Выборочное потребление отдельных аминокислот лейцин, метионин и тирозин было обнаружено в пелагическом микробном сообществе океана (Zubkov et al., 2008).

Ранее было выдвинуто предположение (Трусова, Гладышев, 2006), что, в отличие от традиционных представлений, согласно которым группы водных бактерий подразделяются на потребителей всего класса тех или иных веществ (например, липидов, сахаров, аминокислот), массовые виды бактериопланктона могут оказаться узкоспециализированными, то есть потребляющими преимущественно лишь одно простое вещество. Хорошо известно, что одни и те же виды бактериопланктона обнаруживаются в абсолютно разных экосистемах, кардинально отличающихся по составу продуцентов и консументов (Glockner et al., 2000; Pommier et al., 2007; Trusova, Gladyshev, 2002). Не исключено, что подобный космополитизм (эвритопность) свидетельствует о потреблении бактериопланктоном простых веществ, универсальных для практически всех водных экосистем, например, аминокислот.

Если бы те или иные виды свободноживущих планктонных бактерий потребляли сложные органические метаболиты и продукты разложения других организмов, их присутствие зависело бы от видового состава других групп планктона, как это происходит в случае прикрепленного бактериопланктона (Cole, 1982). Питание простыми субстратами требует узкой специализации гетеротрофов, иначе невозможным становится достижение такого важного фактора устойчивости сообществ, как биоразнообразие.

В связи с упомянутым выше космополитизмом (эвритопностью) возникает вопрос, действительно ли все идентифицированные бактерии изначально присутствовали в природной воде водохранилища, а не были занесены случайно из воздуха или с оборудования при заведомо нестерильном культивировании? Прежде всего, отметим, что полосы *Gly1*, *Gly3*, *Lys1* и *Lys2* присутствовали как в исходной пробе из водохранилища, так и в контроле, но в значительно меньшем количестве, чем в экспериментальных МЭС с соответствующими добавками (рисунок 4.1). Вероятно, *Gly2*, *Gly4* и *Gly5* также содержались в исходной пробе из водохранилища, но не проявлялись при ДГГЭ-анализе. Следует отметить, что метод ДГГЭ позволяет обнаружить генотипы, численность которых в сообществе составляет более 1-2%, поэтому появление новых полос ДНК на «профиле сообщества» свидетельствует, как правило, не о появлении нового вида в экосистеме, а об увеличении его численности до определяемой величины (Muzyer et al., 1993). Важно подчеркнуть, что в контрольной МЭС (рисунок 4.1) в течение всего эксперимента не происходило существенных качественных и количественных изменений состава бактериопланктона по сравнению с исходной пробой. Данный результат хорошо согласуется с полученными ранее доказательствами устойчивого функционирования естественных планктонных сообществ в аналогичных МЭС (Гладышев, 1992). Таким образом, все бактерии *Gly* и *Lys* проявлялись и увеличивали численность в МЭС с добавками аминокислот не в результате артефактов, связанных с нестерильным культивированием, а вследствие до-



бавок определённых аминокислот. В самом деле, известно, что изменения концентрации и качества органического вещества может влиять на успех различных видов бактерий в водных экосистемах (Buck et al., 2009). Добавляемые аминокислоты также являются обычными компонентами воды водохранилища Бугач. В предыдущие годы глицин отмечен среди аминокислот с наиболее высокой концентрацией, его содержание составляло в среднем 7,72% от их общей суммы. Содержание лизина было несколько ниже (4,46%), но эта аминокислота также присутствовала в пробах в течение всего вегетационного сезона (Kalachova et al., 2004).

Структура бактериального сообщества в контрольной МЭС оставалась относительно стабильной на всем протяжении эксперимента по сравнению с резким сдвигом в профиле сообществ с добавками аминокислот. Таким образом, данные по контрольной МЭС дали возможность предположить, что изменения в экспериментальных МЭС вызваны именно добавками. Интересно заметить, что индекс Шеннона в микроэкосистемах со временем значительно не изменился. Значения индекса Шеннона в наших экспериментах были близки таковым в исследованиях других авторов (Øvreås et al., 2003).

Хотя мы связываем проявление и доминирование полос *Gly* именно с добавкой глицина, не исключено, что непосредственно потребляют эту аминокислоту лишь бактерии *Gly1* и *Gly2*. Численность этих бактерий резко увеличилась непосредственно после добавки глицина, а на пятые сутки резко снизилась (рисунок 4.1). Маловероятно, что на снижение численности генотипа *Gly1* оказало влияние «выедание» глицина, поскольку в нашем эксперименте, как и в экспериментах некоторых других авторов (Øvreås et al., 2003), концентрация этой аминокислоты многократно превышала максимальную концентрацию, характерную для водохранилища. Возможно, в снижении численности этих бактерий сыграл роль неизвестный нам лимитирующий фактор. Во-первых, их уменьшение могло быть вызвано выеданием простейшими. Действительно, выедание играет ключевую роль в формировании

морфологического, генотипического и фенотипического состава бактериальных сообществ, и менее активные клетки с большей вероятностью выживают, чем растущие и продуктивные клетки, которые не вырабатывают механизмов защиты от выедания (Lebaron et al., 2001). Во-вторых, уменьшение быстрорастущих популяций может быть из-за видоспецифичного бактериального лизиса (Øvreås et al., 2003).

После снижения численности *Gly1* доминирующее положение в ДГГЭ-профиле бактериального сообщества заняли полосы *Gly3*, *Gly4* и позднее *Gly5* (рисунок 4.1). Появляющиеся во вторую очередь бактериальные популяции с генотипами *Gly3*, *Gly4* и *Gly5*, также, как и неидентифицированные клоны из МЭС с добавлением лизина, могли увеличить свою численность по двум причинам. Во-первых, они могли специализироваться на потреблении соответствующих добавленных аминокислот, однако имели более низкую скорость роста, чем первоначально появившиеся бактериальные популяции. Если появившиеся во вторую очередь популяции бактерий имели высокую устойчивость к выеданию и вирусному лизису, они могли вытеснить появившиеся изначально быстрорастущие популяции (Lebaron et al., 2001). Во-вторых, бактерии, увеличившие численность ближе к концу эксперимента, могли потреблять метаболиты, выделяемые первоначально доминировавшими популяциями, как случилось в других исследованиях (Mou et al., 2008). В целом, динамика бактериальных сообществ в МЭС, а именно очень быстрый отклик популяций, имевших лишь слабые полосы в профиле исходной пробы, и сохранение изначально присутствовавших популяций в ходе эксперимента в контрольной МЭС, хорошо соответствует результатам подобных экспериментов в обогащенных питательными веществами морских мезококсах (Schäfer et al., 2001).

Итак, отдельные виды некультивируемого свободноживущего бактериопланктона оказались узкоспециализированными по способности к потреблению некоторых аминокислот. На добавление отдельной аминокислоты реа-

гировало не всё бактериальное сообщество, а лишь небольшое число популяций, имевших в исходных пробах сравнительно низкую численность. Полученные результаты полностью согласуются с ранее проведенными экспериментами (Трусова, Гладышев, 2006), однако молекулярно-генетическая идентификация узкоспециализированных бактерий проведена впервые.

#### 4.2 Август 2005 г. (II эксперимент)

Фотография ДГГЭ-геля с образцами сообщества бактериопланктона из эксперимента II представлена на рисунке 4.4.

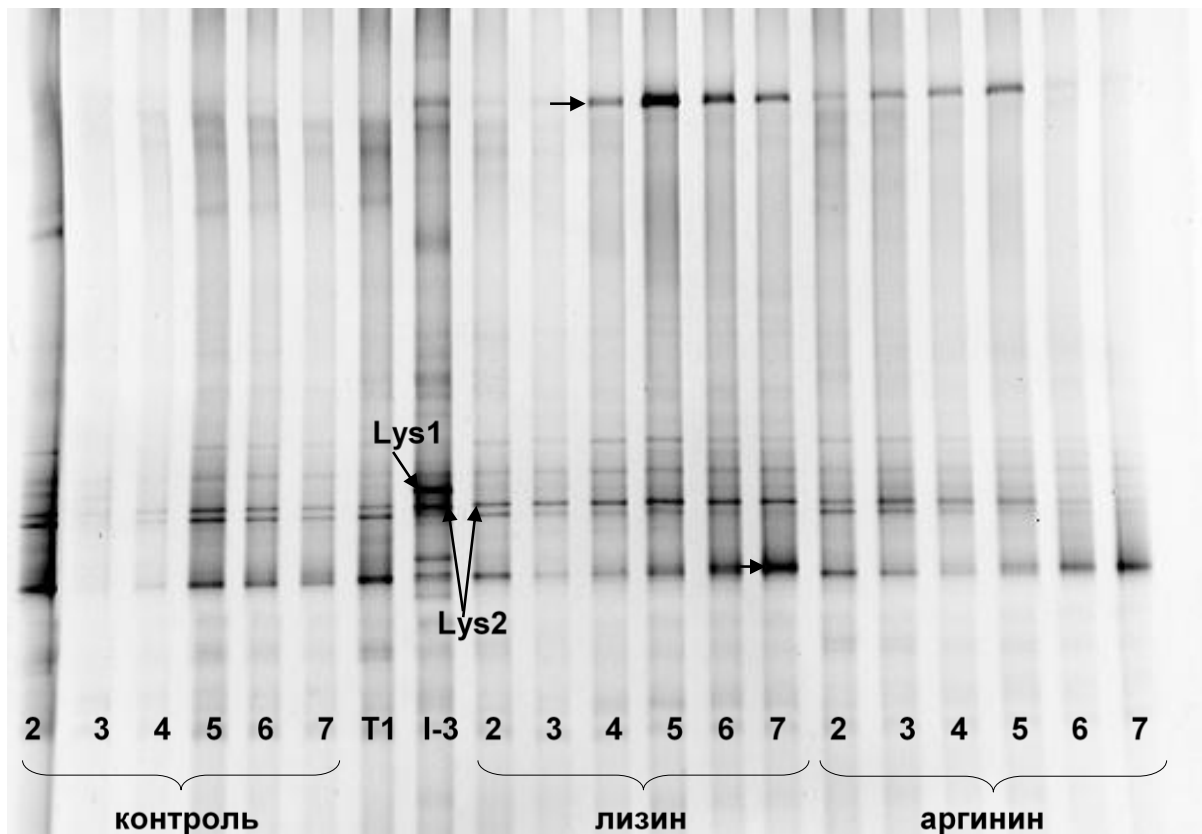


Рисунок 4.4 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из МЭС с добавкой 100 мг/л лизина, МЭС с добавкой 100 мг/л аргинина, контрольной МЭС и исходной пробы (Т1) эксперимента II. Номер дорожки соответствует суткам эксперимента. Для сравнения на дорожке I-3 представлен образец из МЭС с добавлением 100 мг/л лизина эксперимента I (сутки 3)

В контрольной МЭС в течение всего эксперимента не происходило существенных качественных и количественных изменений состава бактериопланктона по сравнению с исходной пробой. Данный результат означает, что в контрольной МЭС в течение всего эксперимента функционировало естественное сообщество бактериопланктона водохранилища. Однако в экспериментальных МЭС в течение первых суток после добавления лизина и аргинина также не произошло значительных изменений состава сообщества бактериопланктона по сравнению с исходной точкой. Лишь к концу эксперимента увеличилась плотность нескольких полос (Рис. 4.4, отмечены стрелками без подписей) в обеих МЭС с добавками аминокислот. Вероятно, эта реакция была вызвана не непосредственно добавкой аминокислот, а другими причинами, обсуждаемыми выше в гл. 4.1.

Во всех пробах эксперимента II выявлены полосы, соответствующие клонам *Lys1* и *Lys2*, потреблявшим лизин в эксперименте I. Это было выяснено благодаря нанесению на гель образца из пробы эксперимента I, взятой на трети на сутки культивирования бактериопланктонного сообщества из МЭС с добавкой лизина. Таким образом, эти виды присутствовали в МЭС в эксперименте II, однако, добавленные аминокислоты они не потребляли, и их численность не увеличивалась.

### 4.3 Май 2006 г. (III эксперимент)

Фотография ДГГЭ-геля с образцами сообщества бактериопланктона из эксперимента III представлена на рисунке 4.5. Как и в эксперименте II, сразу после внесения добавок ни в одной из МЭС эксперимента III не произошло значительных изменений качественного и количественного состава бактериопланктона. Только в МЭС с добавлением лизина в последние двое суток эксперимента вышли в доминанты две новые полосы. Концентрация растворённого в воде лизина постепенно снижалась в ходе эксперимента (таблица

4.1). Предположительно, происходило потребление лизина всем бактериальным сообществом для целей пластического обмена.

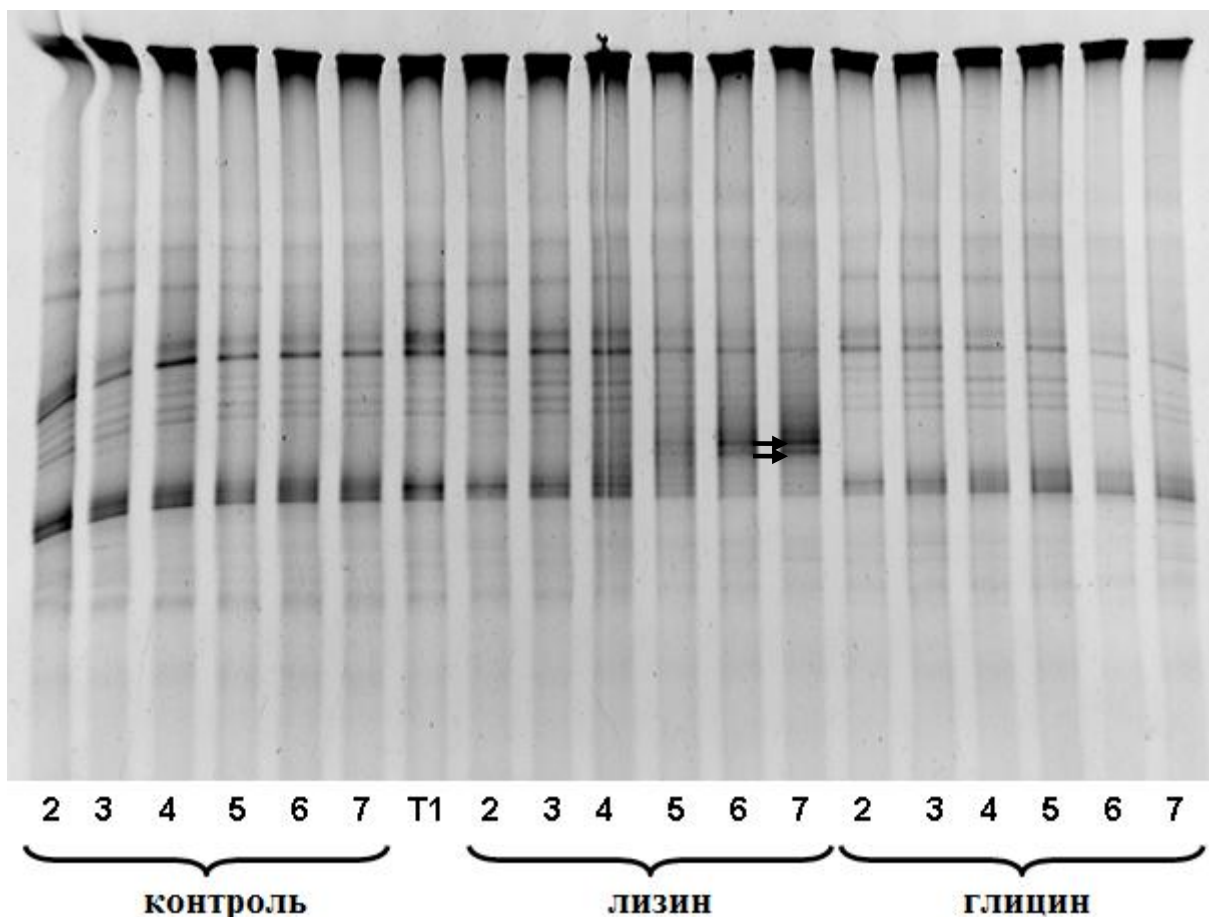


Рисунок 4.5 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из МЭС с добавкой 100 мг/л лизина, МЭС с добавкой 100 мг/л глицина, контрольной МЭС и исходной пробы (Т1) эксперимента III. Номер дорожки соответствует суткам эксперимента

Таблица 4.1 – Концентрация растворённых добавленных аминокислот в воде экспериментальных МЭС эксперимента III (в мг/л)

Дата	18 мая 2006	19 мая 2006	20 мая 2006	21 мая 2006	22 мая 2006	23 мая 2006
МЭС №1 с добавкой 100 мг/л лизина	93,62	90,46	87,75	87,67	88,16	87,60
МЭС №3 с добавкой 100 мг/л глицина	99,14	98,17	96,68	96,25	92,12	94,37

## 4.4 Август 2009 (IV эксперимент)

Фотография ДГГЭ-геля с образцами сообщества бактериопланктона из эксперимента IV представлена на рисунке 4.6.

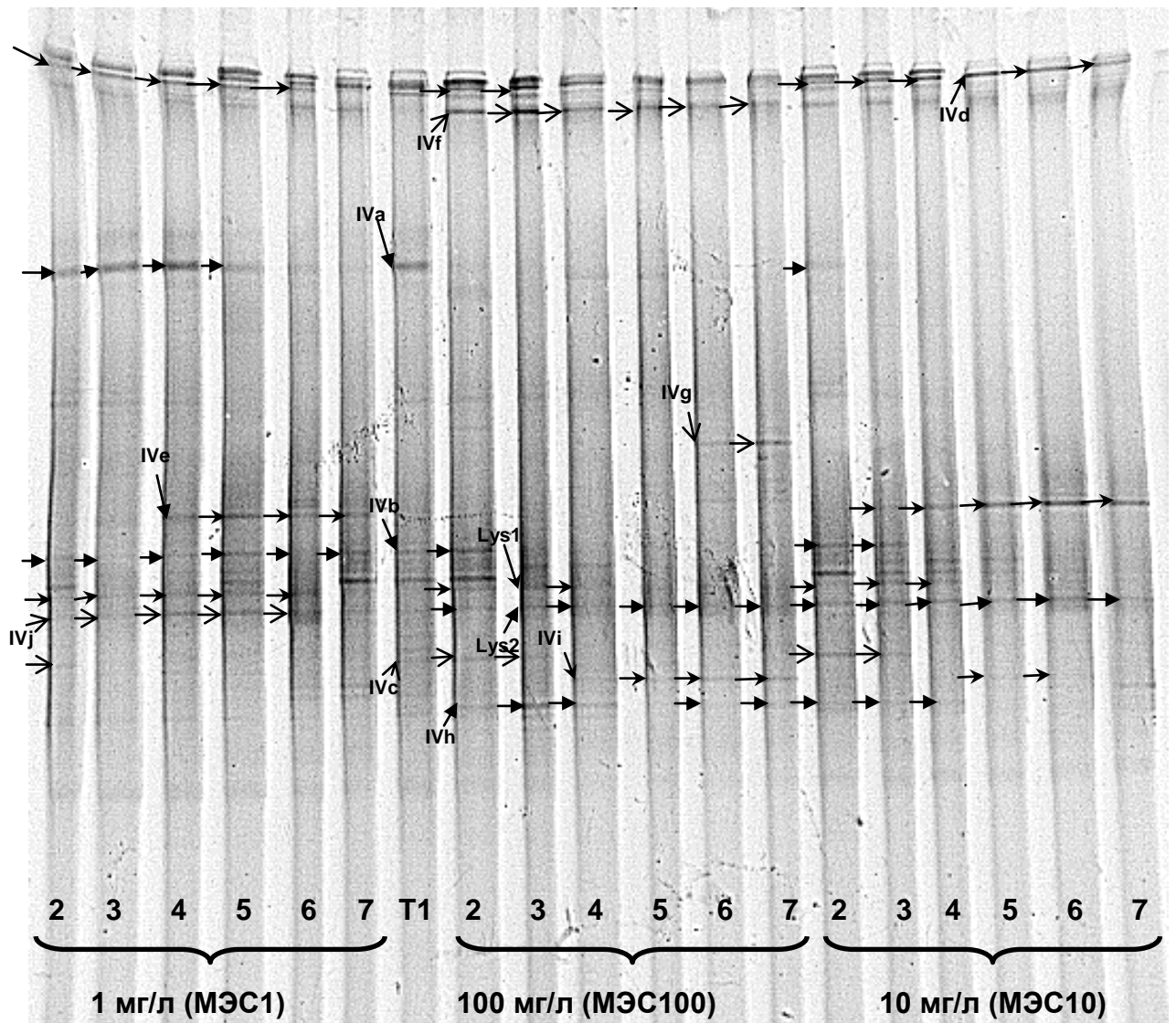


Рисунок 4.6 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из МЭС1 с добавкой 1 мг/л лизина, МЭС10 с добавкой 10 мг/л лизина, МЭС100 с добавкой 100 мг/л лизина, и исходной пробы (Т1) эксперимента IV. Номер дорожки соответствует суткам эксперимента. Стрелками отмечены доминирующие виды

В исходной пробе отмечено 2 субдоминантных вида бактерий, условно обозначенных *IVa* и *IVb*. Во всех МЭС этого эксперимента после добавки ли-

зина произошли значительные изменения качественного и количественного состава бактериопланктона. Уже на вторые сутки в доминанты вышли виды *Lys1* и *Lys2* – те же виды, что потребляли лизин в эксперименте I, как было установлено благодаря повторной постановке ДГГЭ с нанесением на тот же гель образца из МЭС с добавлением 100 мг/л лизина эксперимента I, см. (Трусова и др., 2012). Вид *Lys1* доминировал в течение первых суток во всех МЭС эксперимента IV, а *Lys2* оставался доминантным видом на всём протяжении эксперимента в МЭС с добавкой 10 мг/л лизина (МЭС10) и в МЭС с добавкой 100 мг/л лизина (МЭС100). Поскольку в эксперименте IV после добавления лизина в МЭС в доминанты выходят те же виды *Lys1* и *Lys2*, что и в I эксперименте, значит, отклик летнего сообщества бактериопланктона на добавку аминокислоты устойчив и повторяется в разные годы.

Вид *Iva* продержался в доминантах первые четверо суток только в МЭС с добавкой 1 мг/л лизина (МЭС1). Также в МЭС1 к концу эксперимента вид *Ivb* оставался доминантным. В МЭС10 эти виды продолжали доминировать, но первые 2-3 суток эксперимента, а в МЭС100 все они исчезли из состава доминантов к третьим суткам. Вид *Ivc*, присутствовавший в начальной пробе, но не входивший в число доминантов, исчез из всех МЭС на 3-4 сутки эксперимента. Вид *Ivd*, чьё присутствие в исходной пробе неочевидно из-за близкорасположенных полос в зоне компрессии, вышел в доминанты на вторые сутки во всех МЭС, и сохранял высокую численность в МЭС1 и МЭС10 до конца эксперимента. На третий и четвёртый дни в МЭС с добавками 10 и 1 мг/л лизина соответственно в доминанты вышел и оставался им до конца вид *Ive*. Виды *Ivf* и *Ivg* появились в ходе эксперимента только в МЭС100. Вид *Ivh* и *Ivj*, отсутствовавшие в исходной пробе, появились только в МЭС10 и МЭС100. Вид *Ivj* доминировал только в МЭС1.

В динамике бактериопланктонного сообщества в эксперименте IV можно заметить некоторые закономерности (рисунок 4.6). Вид *Lys1* доминировал во всех МЭС вне зависимости от концентрации лизина. В ходе экспе-

римента 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.

Кластерный анализ сходства проб в эксперименте IV по наличию и плотности полос на геле дал 3 основных кластера (рисунок 4.7).

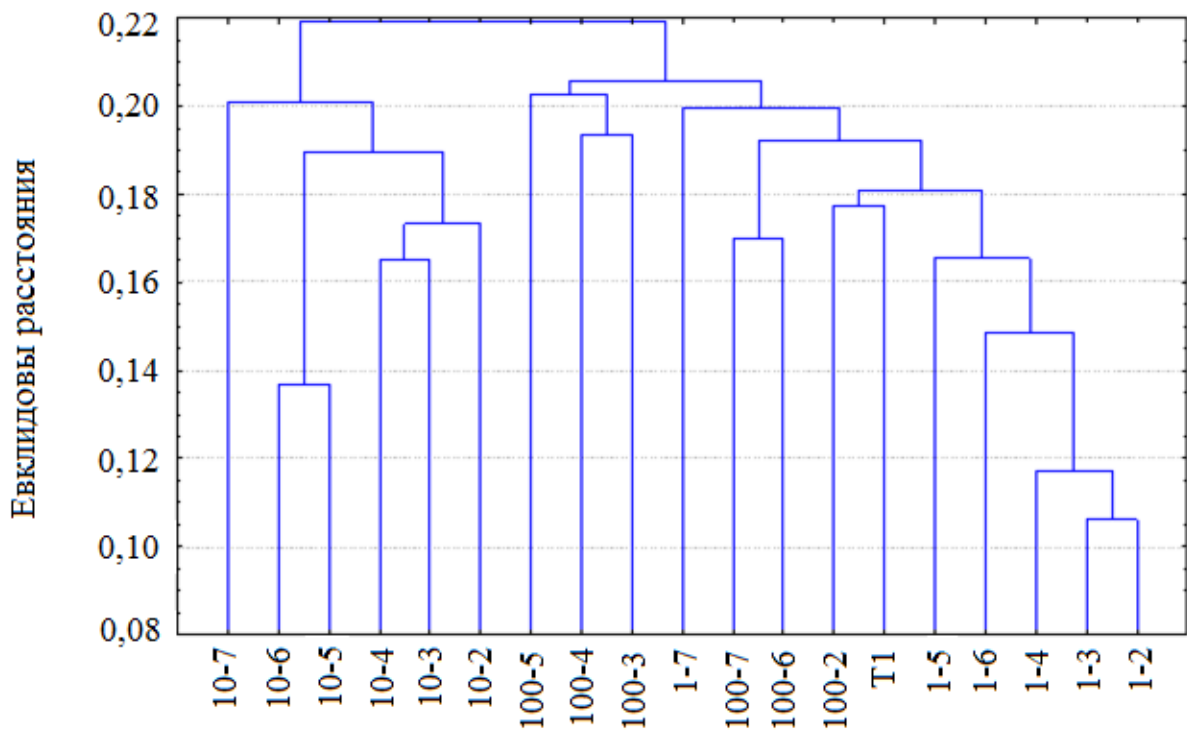


Рисунок 4.7. Кластеризация проб бактериопланктона из МЭС эксперимента IV, в соответствии с данными ДГГЭ. T1 – исходная проба, 1-2 – 1-7 – МЭС с добавлением 10 мг/л лизина, 10-2 – 10-7 – МЭС с добавкой 10 мг/л лизина, 100-2 – 100-7 – МЭС с добавкой 100 мг/л лизина. Численное значение в обозначении проб соответствует суткам эксперимента



Все пробы из МЭС с добавкой 10 мг/л лизина кластеризовались отдельно. Пробы из МЭС1 и МЭС100 распределились по двум соседним кластерам: в один вошли пробы с 3 по 5 сутки эксперимента в МЭС100, а во второй – исходная точка, все пробы из МЭС1 и пробы, взятые на 2, 6 и 7 сутки из МЭС100.

На рис. 4.8 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. Полосы *IVh* и *IVi* кластеризовались вместе с некультивируемыми водными бактериями пор. Acidimicrobiales класса Actinobacteria (97% и 99% сходства с ближайшими родственниками соответственно).

Тип Proteobacteria и группа Fibrobacteres-Bacteroidetes-Chlorobi (FCB) кластеризовались в сестринские клады. Внутри группы FCB сформировалось две сестринские клады: в одну вошли бактерии типа Bacteroidetes, а в другую – некультивируемые представители типа Fibrobacteres, в том числе полоса *IVa*, чье сходство нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК с наиболее родственными клонами составляло 99%. Тип Bacteroidetes состоял из двух клад, соответствующих семействам Flavobacteriaceae (класс Flavobacteriia, порядок Flavobacteriales) и Sphingobacteriaceae (класс Sphingobacteriia, порядок Sphingobacteriales). В кладу семейства Flavobacteriaceae входила полоса *IVf*, на 98% схожая с некультивируемыми бактериями этого семейства, выделенными из различных природных местобитаний. Полосы *IVe* и *IVg* кластеризовались вместе с представителями семейства Sphingobacteriaceae, причём полоса *IVe* была на 99% идентична некультивируемым клонам этого семейства, а *IVg* имела очень отдалённое сходство 89% с ближайшими родственниками.

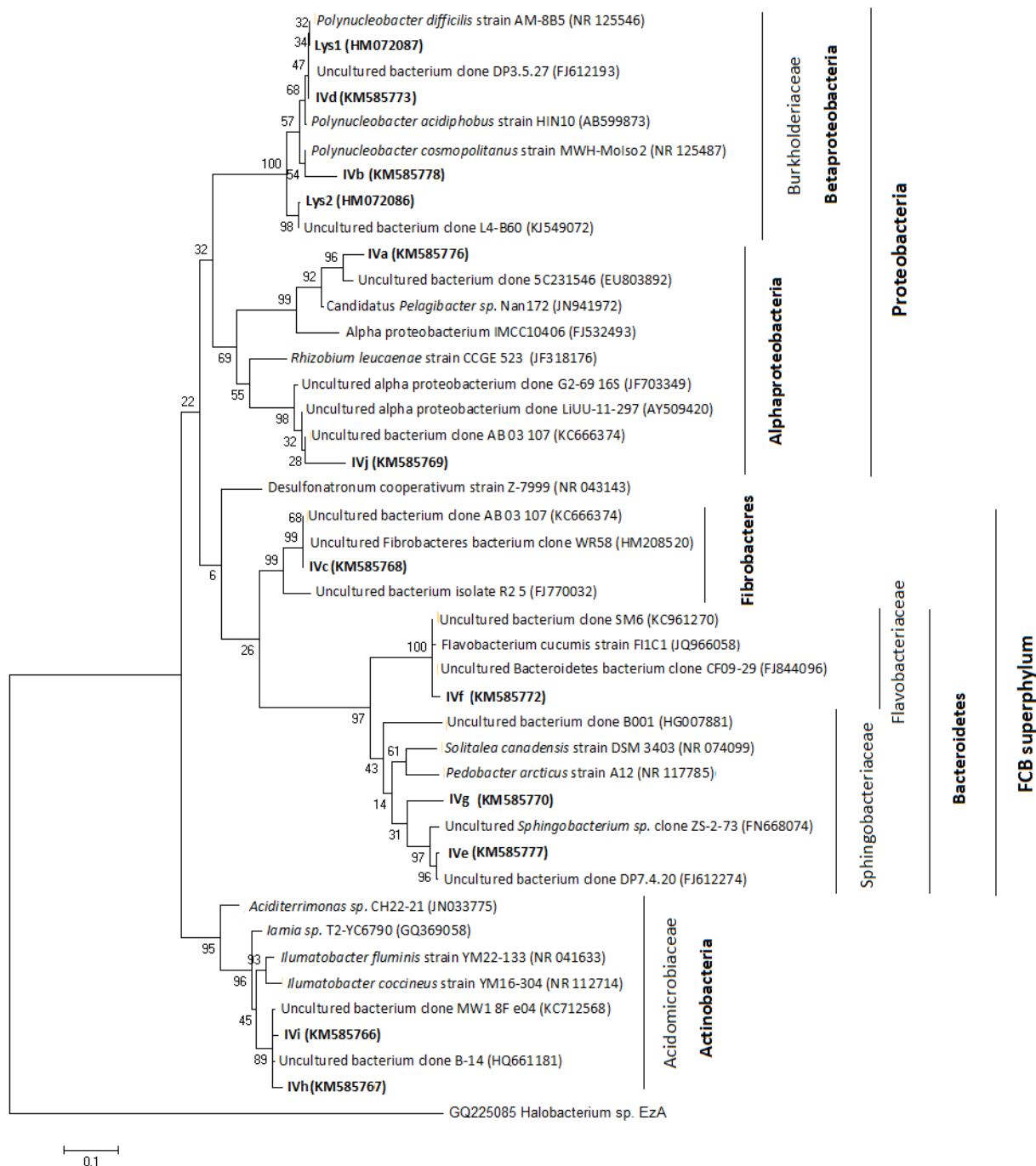


Рисунок 4.8 – Филогенетическое древо, построенное на основе сравнения последовательностей генов 16S рРНК, соответствующих полосам ДГГЭ из микроэкосистем с добавками лизина в экспериментах I и IV. В скобках указаны номера последовательностей в GenBank

Большинство идентифицированных в МЭС бактерий относилось к протеобактериям, а именно альфа- и бетапротеобактериям, образовавшим сестринские клады на филогенетическом древе. Полоса IVa кластеризовалась

вместе с группой некультивируемых представителей Alphaproteobacteria, однако имела лишь 94% сходство с ближайшим родственником – бактерией из озера Гатун (Панама). Полоса *IVj* принадлежала к другой ветви некультивируемых альфапротеобактерий и имела 99% сходства с ближайшими родственниками из разных водных и почвенных источников.

Полосы *IVb* и *IVd* принадлежали к одному семейству бетапиротеобактерий с *Lys1* и *Lys2* – Burkholderiaceae. *IVb* имела отдалённое 95% сходство с *Polynucleobacter cosmopolitanus* – гетеротрофной, аэробной неподвижной бактерией, изолированной из пресноводных мест обитания (Hahn et al., 2010). Полоса *IVd* на 99% схожа с *Polynucleobacter difficilis* (Hahn et al., 2012) и полосой *Lys1*. Однако однозначно утверждать на основании высокого сходства, что *IVd* является этим видом, нельзя, поскольку был изучен лишь фрагмент гена 16S рРНК.

Таким образом, в МЭС с добавками лизина в разных концентрациях наблюдалась различная реакция бактериопланктонного сообщества. Тем не менее, виды, которые потребляли лизин в I эксперименте, вновь вышли в доминанты в IV после добавления данной аминокислоты.

#### 4.5 Май 2013 (V эксперимент)

Фотография ДГГЭ-геля с образцами сообщества бактериопланктона из эксперимента V представлена на рисунке 4.9. Как и в экспериментах II и III, ни в одной из МЭС эксперимента V не произошло значительных изменений качественного и количественного состава бактериопланктона. Однако в профиле сообщества бактериопланктона выявлены полосы *Lys1* и *Lys2*, увеличившие свою плотность в МЭС с добавкой лизина в экспериментах I и IV.

Концентрация растворённого в воде лизина постепенно снижалась в ходе эксперимента (таблица 4.2). Предположительно, происходило потребление

ние лизина всем бактериальным сообществом для целей пластического обмена.

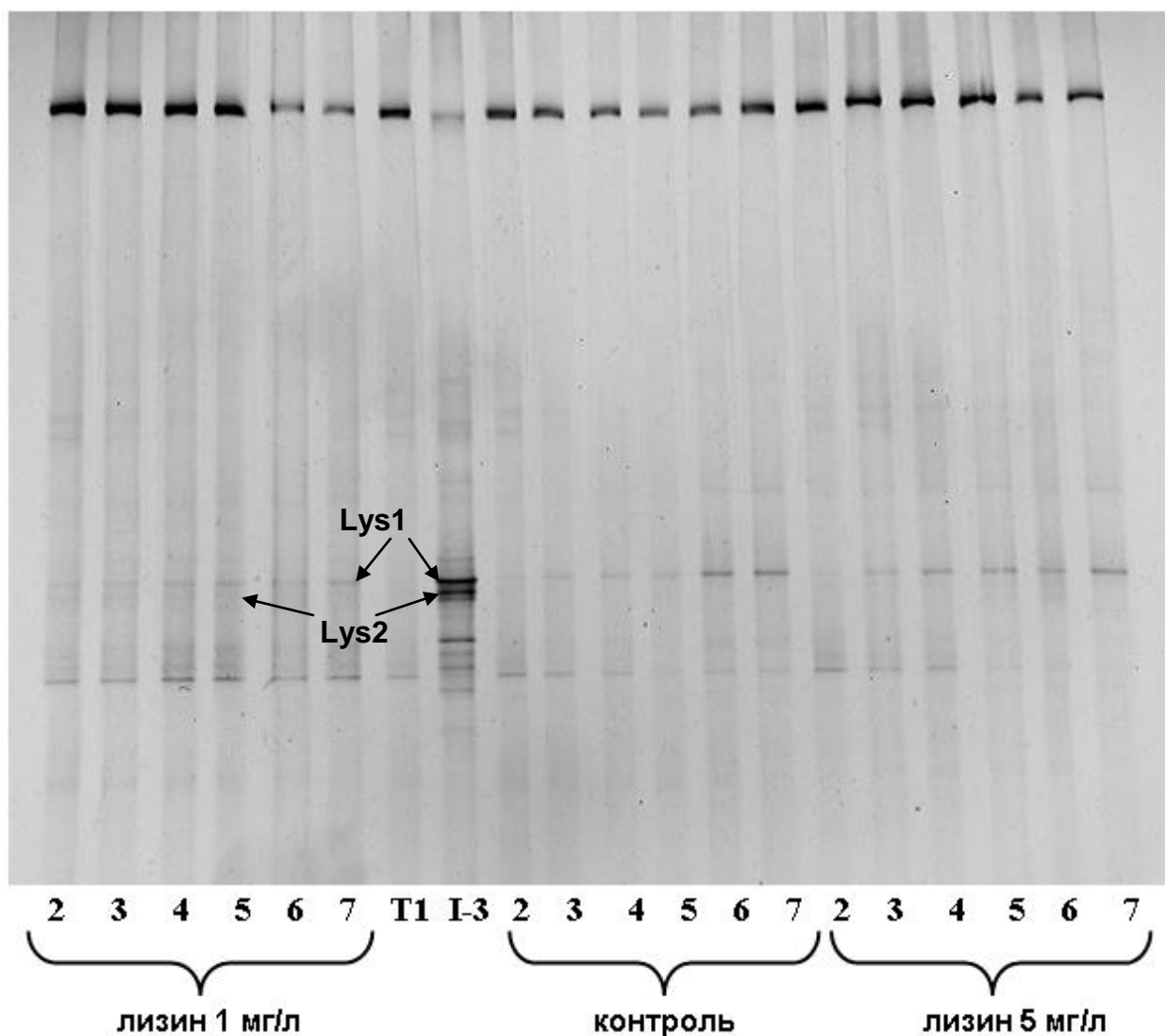


Рисунок 4.9 – ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из МЭС с добавкой 1 мг/л лизина, контрольной МЭС, МЭС с добавкой 5 мг/л лизина и исходной пробы (Т1) эксперимента IV. Номер дорожки соответствует суткам эксперимента. Для сравнения на дорожке I-3 представлен образец из МЭС с добавлением 100 мг/л лизина эксперимента I (сутки 3)

Таблица 4.2 – Содержание растворённого лизина в воде МЭС с добавкой лизина эксперимента V (в мг/л)

Дата	15 мая 2013	16 мая 2013	17 мая 2013	18 мая 2013	19 мая 2013	20 мая 2013
МЭС №1 с добавкой 1 мг/л лизина	0,62	0,45	0,46	0,45	0,35	0,1
МЭС №3 с добавкой 5 мг/л лизина	4,06	3,94	3,96	3,59	3,49	3,57

### Обсуждение

Несмотря на ряд ограничений, экспериментальные микроэкосистемы – хороший инструмент для экологических исследований бактериопланктона (Schäfer et al., 2001). Нестерильное культивирование цельных сообществ в МЭС – единственный экспериментальный метод для исследования некультивируемых видов бактериопланктона, многие из которых не могут существовать вне целостного планктонного сообщества (Amann et al., 1995). Многие авторы культивируют целостные сообщества для изучения эффекта добавок тестируемого субстрата на бактериопланктон (Carlson et al., 2002; Volova et al., 2007). Применение сочетания экспериментов в МЭС с молекулярными методами идентификации бактерий – наиболее адекватный способ для установления связи между структурой (генотипом) и функций (фенотипом) в бактериальном сообществе (Øvreås et al., 2003).

Идентификация видов бактериопланктона важна не только для филогении, но и для экологии. Знания о конкретных видах бактерий и потребляемых ими субстратах в настоящее время могут быть формализованы в математических моделях водных экосистем, предназначенных для прогноза и управления качеством природных вод (Гладышев, 1999; Дегерменджи, Гладышев, 1995). Точность прогноза и успешность управления, несомненно, повысятся

в случае замены в моделях агрегированного бактериопланктона и агрегированного «органического вещества» на конкретные виды бактерий и конкретные виды утилизируемых ими веществ (Адамович, 1992; Гладышев, 1999; Cottrell, Kirchman, 2000; Degermendzhi, 2010).

Основываясь на результатах наших экспериментов, мы считаем, что виды *Gly1* и *Gly2* специализировались на потреблении глицина, а *Lys1* и *Lys2* специализировались на потреблении лизина. Виды *Gly3*, *Gly4* и *Gly5* также могли специализироваться на потреблении глицина, но росли медленнее, либо потребляли вторичные метаболиты популяций *Gly1* и *Gly2*. Также не ясно, потребляли ли добавленные аминокислоты виды, соответствующие другим полосам в I-IV экспериментах, плотность которых увеличивалась к концу культивирования. Так или иначе, было обнаружено, что отдельные таксоны (виды) бактериопланктона специализировались на потреблении добавленных аминокислот в различных концентрациях. Знания о роли гетеротрофных пресноводных бактерий в минерализации органического вещества важны для понимания процесса круговорота углерода в природных водоёмах.

Примечательно, что в экспериментах I (проводился в июле) и IV (в начале августа) после добавления аминокислот произошли значительные изменения в сообществах бактериопланктона экспериментальных МЭС, в то время как в экспериментах II (в конце августа), III и V (в мае) таких изменений не наблюдалось. 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.

В сводной таблице 4.3 представлены экологические параметры МЭС с добавлением лизина в концентрации 100 мг/л экспериментов I-IV.

Таблица 4.3 – Экологические параметры экспериментальных микроэкосистем в экспериментах I-IV

Дата отбора пробы	Номер пробы	Температура воды, °С	Число полос на ДГГЭ-геле	Индекс Шеннона ( <i>H</i> )	Индекс Симпсона ( <i>D</i> )
<b>Эксперимент I</b>					
30.06.2004	0	20,1	28	4,66	0,043
01.07.2004	1	21,6	25	4,44	0,052
02.07.2004	2	21,6	22	4,29	0,057
03.07.2004	3	21,6	19	4,08	0,064
04.07.2004	4	21,6	20	4,14	0,064
05.07.2004	5	21,5	23	4,22	0,069
SD	–	–	–	0,214	0,010
<b>Эксперимент II</b>					
17.08.2005	0	18,8	21	4,29	0,054
18.08.2005	1	18,5	22	4,26	0,059
19.08.2005	2	18,7	21	4,11	0,071
20.08.2005	3	20,6	20	4,15	0,065
21.08.2005	4	21,6	26	4,55	0,049
22.08.2005	5	20,9	23	4,29	0,060
23.08.2005	6	20,5	21	4,21	0,061
SD	–	–	–	0,143	0,007
<b>Эксперимент III</b>					
17.05.2006	0	7,2	23	4,35	0,057
18.05.2006	1	7,2	23	4,3	0,062
19.05.2006	2	7,7	22	4,23	0,064
20.05.2006	3	7,4	24	4,37	0,059
21.05.2006	4	7,8	24	4,38	0,056
22.05.2006	5	7,5	21	4,11	0,068
23.05.2006	6	7,4	21	4,07	0,070
SD	–	–	–	0,126	0,005
<b>Эксперимент IV</b>					
31.07.2009	0	22	20	4,08	0,069
01.08.2009	1	22,8	18	3,87	0,082
02.08.2009	2	22,8	14	3,53	0,101
03.08.2009	3	22,7	19	3,89	0,072
04.08.2009	4	22,7	14	3,61	0,093
05.08.2009	5	22,7	19	4,08	0,065
SD	–	–	–	0,231	0,014

Вариабельность индексов разнообразия Шеннона во II и III экспериментах была гораздо ниже, чем в I и IV экспериментах. То есть, индекс разнообразия подтверждает, что в июле и начале августа сообщества бактериопланктона отреагировали на добавку лизина существенным изменением видового состава, а в мае и конце августа такого отклика не наблюдалось.

Таким образом, обнаруженная в нашей работе узкая специализация видов бактериопланктона в потреблении конкретных органических веществ, а также отсутствие в сообществе специализированных видов, либо их низкая активность в некоторые сезоны, могут иметь значение для понимания процессов самоочищения экосистемы водоема от органических загрязнений. Действительно, если в некоторые периоды времени в водоёме отсутствуют (становятся неактивными) виды, способные утилизировать загрязняющее вещество, то экосистема в такие периоды становится особо уязвимой к антропогенному загрязнению. Например, в экспериментах по изучению динамики самоочищения экосистемы водохранилища от фенола, проведённых в микроэкосистемах по той же методике, что и изучение потребления аминокислот (Gladyshev et al., 1998), было установлено, что в летние месяцы добавленный в микроэкосистемы фенол полностью утилизировался за 2-5 суток, тогда как в мае он не потреблялся в течение 10 дней.

### Резюме

В середине лета добавление лизина и глицина в микроэкосистемы приводило к изменению структуры бактериопланктона, а именно в бактериальном сообществе резко увеличивалась численность видов, потребляющих добавленные аминокислоты, по сравнению с исходной пробой и контрольной микроэкосистемой. Реакция бактериопланктонного сообщества на добавление лизина зависела от концентрации добавляемого вещества. Весенние и позднелетние планктонные сообщества бактерий практически не реагировали



на добавки лизина, глицина и аргинина. Полученные данные дают основание предполагать, что способность экосистемы водоёма к самоочищению от тех или иных загрязняющих органических веществ может существенно зависеть от сезонных особенностей структуры и функции бактериального сообщества.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в данной работе было исследовано биоразнообразие речного бактериопланктона методом секвенирования следующего поколения (NGS) на участке длиной около 1800 км. Установлено, что альфа-разнообразие бактериопланктона не возрастает постепенно с движением вниз по течению, а достигает наибольших показателей на среднем участке р. Енисей ниже места впадения Нижней Тунгуски. Также не подтверждается гипотеза об увеличении относительной доли цианобактерий при движении от истока к устью по концепции речного континуума.

Установлено, что структура бактериального сообщества в р. Енисей существенно зависит от типа берегового ландшафта (биома). На трех участках Енисея, расположенных в районе Енисейского кряжа (горная тайга), в Западно-Сибирской равнине (равнинная тайга), а также ниже места впадения р. Нижняя Тунгуска (лесотундра и тундра в области вечной мерзлоты), обнаружено три бактериальных комплекса, достоверно различающихся по видовому составу и структуре.

В данной работе также были идентифицированы виды бактерий, потребляющие различные аминокислоты в эвтрофном водохранилище. В контрольных МЭС не наблюдалось существенных изменений в составе бактериопланктона по сравнению с исходной пробой на протяжении всего эксперимента. Данный результат означает, что в контрольных МЭС в течение всех экспериментов функционировало естественное сообщество бактериопланктона водохранилища. Виды бактериопланктона, которые увеличивали свою численность при добавлении аминокислот лизин и глицин в экспериментальные микрэкосистемы в середине лета, принадлежали к различным семействам. Отклик одних и тех же видов бактерий на добавку лизина наблюдался летом в разные годы. В это же время не наблюдалось значительного отклика бактериального сообщества на добавление лизина, глицина и аргинина вес-

ной и поздним летом, хотя в составе бактериального сообщества присутствовали виды, потреблявшие аминокислоты летом. Вероятно, отсутствие потребления аминокислот было обусловлено низкими температурами воды или иными неблагоприятными факторами среды в мае и конце августа. Полученные результаты свидетельствуют в пользу гипотезы об узкой специализации видов бактериопланктона в потреблении отдельных органических веществ и дают основание предполагать, что способность экосистемы водоёма к самоочищению от тех или иных органических веществ может существенно зависеть от сезонной сукцессии бактериального сообщества.

Идентификация видов бактериопланктона, потребляющих различные органические вещества, важна не только для филогении, но и для экологии. Знания о конкретных видах 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 геноипе организмов (Гладышев, 1999). Продолжением исследований, проведённых в этой работе, может стать определение этих кинетических характеристик различных видов водных бактерий. В настоящее время во многих моделях качества природных вод гетеротрофный бактериопланктон описывается как агрегированная компонента, что не позволяет адекватно отображать функциональную роль доминирующих видов. 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 вида»). Альфа-разнообразие сообществ бактериопланктона и относительная доля цианобактерий в р. Енисей достигают максимальных значений в среднем течении реки.

2) В бактериопланктоне р. Енисей выявлены три комплекса (сообщества), достоверно отличающиеся по видовому составу и структуре, которые, вероятно, 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). Согласно имеющимся данным, доминирующие таксоны каждого из комплексов специализируются в потреблении разных групп органических веществ.

3) С использованием нестерильного культивирования в экспериментальных микрэкосистемах 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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамович, В. В. Экспериментальное определение параметров функционирования микрофлоры Красноярского водохранилища / В. В. Адамович // Водные ресурсы. – 1992. – Т. 2. – С. 106-114.
2. Вернадский, В. И. Живое вещество / В. И. Вернадский. М.: Наука, 1978. – 358 с.
3. Гладышев, М. И. Основы экологической биофизики водных систем / М. И. Гладышев. – Новосибирск: Наука, 1999. – 115 с.
4. Гладышев, М. И. Экспериментальные экосистемы и их применение для изучения биodeградации легкоокисляемых токсикантов в пелагиали (обзор) / М. И. Гладышев // Гидробиологический журнал. – 1992. – Т. 28.– № 5. – С. 68–77.
5. Горленко, В. М. Экология водных микроорганизмов / В. М. Горленко, Г. А. Дубинина, С. И. Кузнецов. – М.: Наука, 1977. – 288 с.
6. Дегерменджи, А. Г. Природные воды, математические модели / А. Г. Дегерменджи, М. И. Гладышев // Вестник РАН. – 1995. – Т. 65. – № 5. – С. 807–810.
7. Дрюккер, В. В. Бактериопланктон реки Енисей / В. В. Дрюккер, В. И. Петрова; под ред. М. И. Новожилова; Лимнол. ин-т. Сиб. отд-ние АН СССР. – Новосибирск: Наука, 1988. – 98 с.
8. Заварзин, Г. А. Лекции по природоведческой микробиологии / Г. А. Заварзин; отв. ред. Н. Н. Колотилова; Ин-т микробиологии. – М.: Наука, 2004. – 348 с.
9. Колмакова, О. В. Потребление аминокислот некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища / О. В. Колмакова, М. Ю. Трусова // Сибирский экологический журнал. – 2011. – № 1. – С. 13–21.

10. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стили, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 432 с.
11. Приймаченко, А. Д. Продукционно-гидробиологические исследования Енисея / А. Д. Приймаченко, Н. Г. Шевелева, Т. Н. Покатилова, И. Л. Пырина; отв. ред. Г. И. Галазий, А. Д. Приймаченко. – Новосибирск : Наука, 1993. – 196 с.
12. Трусова, М. Ю. Идентификация видового состава и изучение сезонной динамики бактериопланктона малых эвтрофных водохранилищ методами молекулярной генетики: дис. на соиск. уч. степ. канд. биол. наук : 03.00.02, 03.00.18 / Трусова Мария Юрьевна. – Красноярск, 2004. – 123 с.
13. 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.
14. Трусова, М. Ю. Экспериментальное определение органических субстратов, утилизируемых некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища / М. Ю. Трусова, М. И. Гладышев // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 409. – № 1. – С. 136–138.
15. Adamczyk, J. The isotope array, a new tool that employs substrate-mediated labeling of rRNA for determination of microbial community structure and function / J. Adamczyk, M. Hesselsoe, N. Iversen, M. Horn, A. Lehner, P. H. Nielsen, M. Schloter, P. Roslev, M. Wagner // Applied Environmental Microbiology. – 2003. – V. 69. – I. 11. – P. 6875–6887.
16. Amann, R. I. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation / R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer // Microbiological Reviews. – 1995. – V. 59. – I. 1. – P. 143–169.
17. Amon, R. M. W. Dissolved organic matter sources in large Arctic rivers / R. M. W. Amon, A. J. Rinehart, S. Duan, P. Louchouart, A. Prokushkin, G.

Guggenberger, D. Bauch, C. Stedmon, P. A. Raymond, R. M. Holmes, J. W. McClelland, B. J. Peterson, S. A. Walker, A.V. Zhulidov // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2012. – V. 94. – P. 217–237.

18. Andreasen, K. Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge / K. Andreasen, P. H. Nielsen // *Applied Environmental Microbiology*. – 1997. – V. 63. – I. 9. – P. 3662–3668.

19. Aponasenko, A. D. The effect of tributaries on the environmental conditions in the Enisei River / A. D. Aponasenko, V. V. Dryukker, L. M. Sorokovikova, L. A. Shchur // *Water Resources*. – 2010. – V. 37. – I. 6. – P. 817–824.

20. Baker, G. C. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers / G. C. Baker, J. J. Smith, D. A. Cowan // *Journal of Microbiological Methods*. – 2003. – V. 55. – I. 3. – P. 541–555.

21. Barriuso, J. Estimation of bacterial diversity using next generation sequencing of 16S rDNA: a comparison of different workflows / J. Barriuso, J. R. Valverde, R. P. Mellado // *BMC Bioinformatics*. – 2011. – V. 12. – I. 1. – P. 473.

22. Behrens, S. Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS / S. Behrens, T. Lösekann, J. Pett-Ridge, P. K. Weber, W.-O. Ng, B. S. Stevenson, I. D. Hutcheon, D. A. Relman, A. M. Spormann // *Applied Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 74. – I. 10. – P. 3143–3150.

23. Berry, D. Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification / D. Berry, K. B. Mahfoudh, M. Wagner, A. Loy // *Applied Environmental Microbiology*. – 2011. – V. 77. – I. 21. – P. 7846–7849.

24. Besemer, K. Headwaters are critical reservoirs of microbial diversity for fluvial networks / K. Besemer, G. Singer, C. Quince, E. Bertuzzo, W. Sloan, T.

J.Battin // Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2013. – V. 280. – No. 1771. – 20131760.

25. Bhadra, B. Fluctuation in recoverable nickel and zinc resistant copiotrophic bacteria explained by the varying zinc ion content of Torsa River in different months / B. Bhadra, A. K. Nanda, R. Chakraborty // Archives of Microbiology. – 2007. – V. 188. – I. 3. – P. 215–224.

26. Boström, K. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis / K. Boström, K. Simu, A. Hagstrom, L. Riemann // Limnology and Oceanography Methods. – 2004. – V. 2. – P. 365–373.

27. Brettar, I. Analysis of bacterial core communities in the central Baltic by comparative RNA-DNA-based fingerprinting provides links to structure-function relationships / I. Brettar, R. Christen, M. G. Höfle // THE ISME Journal. – 2012. – V. 6. – I. 1. – P. 195–212.

28. Brettar, I. Identification of a *Thiomicrospira denitrificans*-like epsilonproteobacterium as a catalyst for autotrophic denitrification in the central Baltic Sea / I. Brettar, M. Labrenz, S. Flavier, J. Bötzel, H. Kuosa, R. Christen // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – V. 72. – I. 2. – P. 1364–1372.

29. Brown, J. M. Influence of habitat confluence on aquatic microbial assemblages in experimental mesocosms / J. M. Brown, N. R. Felice, N. B. Scalfone, I. Hewson // Aquatic Microbial Ecology. – 2012. – V. 66. – I. 1. – P. 33–40.

30. Buck, U. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake / U. Buck, H.-P. Grossart, R. Amann, J. Pernthaler // Environmental Microbiology. – 2009. – V. 11. – I. 7. – P. 1854–1865.

31. Caporaso, J. G. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample / J. G. Caporaso, C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, C. A. Lozupone, P. J. Turnbaugh, N. Fierer, R. Knight // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – V. 108. – P. 4516–4522.



32. Caporaso, J. G. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data / J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, R. Knight // *Nature Methods*. – 2010. – V. 7. – I. 5. – P. 335–336.

33. Caporaso, J. G. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms / J. G. Caporaso, C. L. Lauber, W. A. Walters, D. Berg-Lyons, J. Huntley, N. Fierer, S. M. Owens, J. Betley, L. Fraser, M. Bauer, N. Gormley, J. A. Gilbert, G. Smith, R. Knight // *The ISME Journal*. – 2012. – V. 6. – I. 8. – P. 1621–1624.

34. Carlson, C. A. Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea / C. A. Carlson, S. J. Giovannoni, D. A. Hansell, S. J. Goldberg, R. Parsons, M. P. Otero, K. Vergin, B. R. Wheeler // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2002. – V. 30. – I. 1. – P.19–36.

35. Caron, D. A. Hypotheses on the role of the protistan rare biosphere in a changing world / D. A. Caron, P. D. Countway // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2009. – V. 57. – I. 3. –P. 227–238.

36. Cases, I. The grammar of (micro)biological diversity / I. Cases, V. de Lorenzo // *Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 4. – I. 11. –P. 623–627.

37. Castagno, L. N. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from *Lotus tenuis* rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina) / L. N. Castagno, M. J. Estrella, A. I. Sannazzaro, A. E. Grassano, O. A. Ruiz // *Journal of Applied Microbiology*. – 2011. – V. 110. – I. 5. – P. 1151–1165.

38. Chauhan, A. Fatty acid-oxidizing consortia along a nutrient gradient in the Florida Everglades / A. Chauhan, A. Ogram // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – I. 4. – P. 2400–2406.

39. Cole, J. J. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems / J.J. Cole // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. – 1982. – V. 13. – I. 1. – P. 291–314.

40. Collins, G. Determination and localisation of in situ substrate uptake by anaerobic wastewater treatment granular biofilms / G. Collins, T. Mahony, A. M. Enright, A. Gieseke, D. de Beer, V. O’Flaherty // *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*. – 2007. – V. 55. – I. 8–9. – P. 369–376.

41. Connon, S. A. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates / S. A. Connon, S. J. Giovannoni // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2002. – V. 68. – I. 8. – P. 3878–3885.

42. Cottrell, M. T. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the cytophaga-flavobacter cluster consuming low- and high- molecular-weight dissolved organic matter/ M. T. Cottrell, D. L. Kirchman // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – I. 4. – P. 1692–1697.

43. Crump, B. C. Circumpolar synchrony in big river bacterioplankton / B. C. Crump, B. J. Peterson, P. A. Raymond, R. M. W. Amon, A. Rinehart, J. W. McClelland // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106. – I. 50. – P. 21208–21212.

44. Degermendzhi, A. Coexistence of microbial populations and autostabilization of regulating factors in continuous culture: theory and experiments / A. Degermendzhi // *Aquatic Ecology*. – 2010. – V. 44. – I. 3. – P. 541–560.

45. DeSantis, T. Z. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB / T. Z. DeSantis, P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, G. L. An-

dersen // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2006. – V. 72. – I. 7. – P. 5069–5072.

46. Dittmar, T. The biogeochemistry of the river and shelf ecosystem of the Arctic Ocean: a review / T. Dittmar, G. Kattner // *Marine Chemistry*. – 2003. – V. 83. – I. 3–4. – P. 103–120.

47. Dunbar, J. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning / J. Dunbar, S. Takala, S. M. Barns, J. A. Davis, C. R. Kuske // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1999. – V. 65. – I. 4. – P. 1662–1669.

48. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST / R. C. Edgar // *Bioinformatics*. – 2010. – V. 26. – I. 19. – P. 2460–2461.

49. Ellis, E. E. Factors controlling water-column respiration in rivers of the central and southwestern Amazon Basin / E. E. Ellis, J. E. Richey, A. K. Aufdenkampe, A. V. Krusche, P. D. Quay, C. Salimon, H. Brandão da Cunha // *Limnology and Oceanography*. – 2012. – V. 57. – I. 2. – P. 527–540.

50. Engel, P. Standard methods for research on *Apis mellifera* gut symbionts / P. Engel, R. R. James, R. Koga, W. K. Kwong, Q. S. McFrederick, N. A. Moran // *Journal of Apicultural Research*. – 2013. – V. 52. – I. 4. – P. 1–24.

51. Fortunato, C. S. Spatial variability overwhelms seasonal patterns in bacterioplankton communities across a river to ocean gradient / C. S. Fortunato, L. Herfort, P. Zuber, A. M. Baptista, B. C. Crump // *THE ISME Journal*. – 2012. – V. 6. – I. 3. – P. 554–563.

52. Frost, M. R. Prevention of depurination during elution facilitates the reamplification of DNA from differential display gels / M. R. Frost, J. A. Guggenheim // *Nucleic Acids Research*. – 1999. – V. 27. – I. 15. – e6.

53. Fuhrman, J. A. Community structure of marine bacterioplankton: patterns, networks, and relationships to function / J. A. Fuhrman, J. A. Steele // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2008. – V. 53. – I. 1. – P. 69–81.

54. Gebhardt, A. C. Recent articulate organic carbon and total suspended

matter fluxes from the Ob and Yenisei Rivers into the Kara Sea (Siberia) / A. C. Gebhardt, B. Gaye-Haake, D. Unger, N. Lahajnar, V. Ittekkot // *Marine Geology*. – 2004. – V. 207. – I. 1–4. – P. 225–245.

55. Ghai, R. Metagenomics of the water column in the pristine upper course of the Amazon River / R. Ghai, F. Rodriguez-Valera, K. D. McMahon, D. Toyama, R. Rinke, T. C. Souza de Oliveira, J. W. Garcia, F. Pellon de Miranda, F. Henrique-Silva // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – e23785. DOI: 10.1371/journal.pone.0023785.

56. Gieseke, A. *In situ* substrate conversion and assimilation by nitrifying bacteria in a model biofilm / A. Gieseke, J. L. Nielsen, R. Amann, P. H. Nielsen, D. De Beer // *Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 7. – I. 9. – P. 1392–1404.

57. Giovannoni, S. J. Molecular diversity and ecology of microbial plankton / S. J. Giovannoni, U. Stingl // *Nature*. – 2005. – V. 437. – I. 7057. – P. 343–348.

58. Gladyshev, M. I. Disappearance of phenol in water samples taken from the Yenisei River and the Krasnoyarsk reservoir / M. I. Gladyshev, I. V. Gribovskaya, V. V. Adamovich // *Water Research*. – 1993. – V. 27. – I. 6. – P. 1063–1070.

59. Gladyshev, M. I. Influence of anthropogenic pollution on content of essential polyunsaturated fatty acids in links of food chain of river ecosystem / M. I. Gladyshev, O. V. Anishchenko, N. N. Sushchik, G. S. Kalacheva, I. V. Gribovskaya, A. V. Ageev // *Contemporary Problems of Ecology*. – 2012. – V. 5. – I. 4. – P. 376–385.

60. Gladyshev, M. I. Seasonal correlations of elemental and  $\omega$ 3 PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir / M. I. Gladyshev, N. N. Sushchik, A. A. Kolmakova, G. S. Kalachova, E. S. Kravchuk, E. A. Ivanova, O. N. Makhutova // *Aquatic Ecology*. – 2007. – V. 41. – I. 1. – P. 9–23.

61. Gladyshev, M. I. The effect of algal blooms on the disappearance of phenol in a small forest pond / M. I. Gladyshev, N. N. Sushchik, G. S. Kalachova, L. A. Shchur // *Water Research*. – 1998. – V. 32. – I. 9. – P. 2769–2775.
62. Glockner, F. O. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of Actinobacteria / F. O. Glockner, E. Zaichikov, N. Belkova, L. Denissova, J. Pernthaler, A. Pernthaler, R. Amann // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2000. – V. 66. – I. 11. – P. 5053–5065.
63. Gotelli, N. Estimating species richness / N. Gotelli, R. Colwell // In: Magurran AE, McGill BJ (eds). *Biological diversity*, Oxford University Press: Oxford 2011, pp. 39–54.
64. Gray, N. D. Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria / N. D. Gray, I. M. Head // *Environmental Microbiology*. – 2001. – V. 3. – I. 8. – P. 481–492.
65. Grossart, H.-P. Ecological consequences of bacterioplankton lifestyles: changes in concepts are needed / H.-P. Grossart // *Environmental Microbiology Reports*. – 2010. – V. 2. – I. 6. – P. 706–714.
66. Grover, J. P. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes / J. P. Grover, T. H. Chrzanowski // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2000. – V. 23. – I. 1. – P. 41–54.
67. Hahn, M. W. *Polynucleobacter cosmopolitanus* sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers / M. W. Hahn, E. Lang, U. Brandt., H. Lünsdorf, Q. L. Wu, E. Stackebrandt // *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2010. – V. 60. – Pt. 1. – P. 166–173.
68. Hahn, M.W. *Polynucleobacter difficilis* sp. nov., a planktonic freshwater bacterium affiliated with subcluster B1 of the genus *Polynucleobacter* / M. W. Hahn, A. Minasyan, E. Lang, U. Koll, C. Spröer // *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – Pt. 2. – P. 376–383.

69. Hamasaki, K. Actively growing bacteria in the inland sea of Japan, identified by combined bromodeoxyuridine immunocapture and denaturing gradient gel electrophoresis / K. Hamasaki, A. Taniguchi, Y. Tada, R. A. Long, F. Azam // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V 73. – I. 9. – P. 2787–2798.
70. Heidelberg, K. B. Marine genomics: at the interface of marine microbial ecology and biodiscovery / K. B. Heidelberg, J. A. Gilbert, I. Joint // *Microbial Biotechnology*. – 2010. – V. 3. – I. 5. – P. 531–543.
71. Hessen, D. O. Input of organic carbon as determinant of nutrient fluxes, light climate and productivity in the Ob and Yenisey estuaries / D. O. Hessen, J. Carroll, B. Kjeldstad, A. A. Korosov, L. H. Pettersson, D. Pozdnyakov, K. Sørensen // *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. – 2010. – V. 88. – I. 1. –P. 53–62.
72. Hofle, M. G. Molecular diversity of bacterioplankton: link to a predictive biogeochemistry of pelagic ecosystems / M. G. Hofle, D. L. Kirchman, R. Christen, I. Brettar // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2008. – V. 53. – I. 1. –P. 39–58.
73. Holmes, R. M. Seasonal and annual fluxes of nutrients and organic matter from large rivers to the Arctic Ocean and surrounding seas / R. M. Holmes, J. W. McClelland, B. J. Peterson, S. E. Tank, E. Bulygina, T. I. Eglinton, V. V. Gordeev, T. Y. Gurtovaya, P. A. Raymond, D. J. Repeta, R. Staples, R. G. Striegl, A. V. Zhulidov, S. A. Zimov // *Estuaries Coasts*. – 2012. – V. 35. – I. 2. – P. 369–382.
74. Huang, W. E. Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function / W. E. Huang, K. Stoecker, R. Griffiths, L. Newbold, H. Daims, A. S. Whiteley, M. Vagner // *Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 9. – I. 8. – P. 1878–1889.

75. Jeffers, J. N. R. An introduction to systems analysis, with ecological applications / J. N. R. Jeffers. – Baltimore: University Park Press, 1978. – 198 p.
76. Kalachova, G. S. Seasonal dynamics of amino acids in two small Siberian reservoirs dominated by prokaryotic and eukaryotic phytoplankton / G. S. Kalachova, A. A. Kolmakova, M. I. Gladyshev, E. S. Kravchuk, E. A. Ivanova // Aquatic Ecology. – 2004. – V. 38. – I. 1. – P. 3–15.
77. Klindworth, A. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies / A. Klindworth, E. Pruesse, T. Schweer, J. Peplies, C. Quast, M. Horn, F. O. Glöckner // Nucleic Acids Research. – 2013. – V. 41. – I. 1. – e1.
78. Kopylov, A. I. Planktonic viruses, heterotrophic bacteria, and nanoflagellates in fresh and coastal marine waters of the Kara Sea Basin (the Arctic) / A. I. Kopylov, D. B. Kosolapov, E. A. Zobotkina, P. V. Boyarskii, V. N. Shumilkin, N. A. Kuznetsov // Inland Water Biology. – 2012. – V. 5. – I. 3. – P. 241–249.
79. Kravchuk, E. S. Spatial distribution of resting stages (akinetes) of the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* in sediments and its influence on pelagic populations / E. S. Kravchuk, E. A. Ivanova, M. I. Gladyshev // Marine and Freshwater Research. – 2011. – V. 62. – I. 5. – P. 450–461.
80. Kreuzer-Martin, H. W. Stable isotope probing: linking functional activity to specific members of microbial communities / H. W. Kreuzer-Martin // Soil Science Society of America Journal. – 2007. – V. 71. – I. 2. – P. 611–619.
81. Kunin, V. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics / V. Kunin, A. Copeland, A. Lapidus, K. Mavromatis, P. Hugenholtz // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2008. – V. 72. – I. 4. – P. 557–578.
82. Laniece, P. A new high resolution radioimager for the quantitative analysis of radiolabelled molecules in tissue section / P. Laniece, Y. Charon, A. Cardona, L. Pinot, S. Maitrejean, R. Mastroioppo, B. Sandkamp, L. Valentin // Journal of Neuroscience Methods. – 1998. – V. 86. – I. 1. – P. 1–5.

83. Lawrence, D. Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment / D. Lawrence, F. Fiegna, V. Behrends, J. G. Bundy, A. B. Phillimore, T. Bell, T. G. Barraclough // *PLoS Biology*. – 2012. – V. 10. – I. 5. – e1001330. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001330.
84. Lebaron, P. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in abundances, activity and composition / P. Lebaron, P. Servais, M. Troussellier, C. Courties, G. Muyzer, L. Bernard, H. Schäfer, R. Pukall, E. Stackebrandt, T. Guindulain, J. Vives-Rego // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2001. – V. 34. – I. 3. – P. 255–266.
85. Lechene, C. High-resolution quantitative imaging of mammalian and bacterial cells using stable isotope mass spectrometry / C. Lechene, F. Hillion, G. McMahon, D. Benson, A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, D. Distel, Y. Luyten, J. Bonventre, D. Hentschel, K. M. Park, S. Ito, M. Schwartz, G. Benichou, G. Slodzian // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 5. – I. 6. – 20.
86. Lindh, M. V. Consequences of increased temperature and acidification on bacterioplankton community composition during a mesocosm spring bloom in the Baltic Sea / M. V. Lindh, L. Riemann, F. Baltar, C. Romero-Oliva, P. S. Salomon, E. Granéli, J. Pinhassi // *Environmental Microbiology Reports*. – 2013. – V. 5. – I. 2. – P. 252–262.
87. Logue, J. B. Progress in the ecological genetics and biodiversity of freshwater bacteria / J. B. Logue, H. Bürgmann, C. T. Robinson // *BioScience*. – 2008. – V. 58. – I. 2. – P. 103–113.
88. Mardis, E. R. Next-generation DNA sequencing methods / E. R. Mardis // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2008. – V. 9. – I. 1. – P. 387–402.
89. Maron, P.-A. Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology / P.-A. Maron, L. Ranjard, C. Mougel, P. Lemanceau // *Microbial Ecology*. – 2007. – V. 53. – I. 3. – P. 486–493.



90. Martin, A. Preliminary evidence for the microbial loop in Antarctic sea ice using microcosm simulations / A. Martin, A. McMinn, S. K. Davy, M. J. Anderson, H. C. Miller, J. A. Hall, K. G. Ryan // *Antarctic Science*. – 2012. – V. 24. – I. 6. – P. 547–553.
91. Masella, A. P. PANDAseq: paired-end assembler for Illumina sequences / A. P. Masella, A. K. Bartram, J. M. Truszkowski, D. G. Brown, J. D. Neufeld // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – V. 13. – I. 1. – P. 31.
92. McDonald, D. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of Bacteria and Archaea / D. McDonald, M. N. Price, J. Goodrich, E. P. Nawrocki, T. Z. DeSantis, A. Probst, G. L. Andersen, R. Knight, P. Hugenholtz // *The ISME Journal*. – 2012. – V. 6. – I. 3. – P. 610–618.
93. Meon, B. Heterotrophic bacterial activity and fluxes of dissolved free amino acids and glucose in the Arctic rivers Ob, Yenisei and the adjacent Kara Sea / B. Meon, R. M. W. Amon // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2004. – V. 37. – I. 2. – P. 121–135.
94. Mou, X. Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean / X. Mou, S. Sun, R. A. Edwards, R. E. Hodson, M. A. Moran // *Nature*. – 2008. – V. 451. – I. 7179. – P. 708–711.
95. Mueller-Spitz, S. R. Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan / S. R. Mueller-Spitz, G. W. Goetz, S. L. McLellan // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2009. – V. 67. – I. 3. – P. 511–522.
96. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E. C. de Waal, A. G. Uitterlinden // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1993. – V. 59. – I. 3. – P. 695–700.
97. Narancic, T. Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments / T. Narancic, L. Djokic, S. T. Kenny, K. E.

O'Connor, V. Radulovic, J. Nikodinovic-Runic, B. Vasiljevic // *Journal of Hazardous Materials*. – 2012. – V. 215-216. – P. 243–251.

98. Nardini E. *Microbial Biodiversity and Molecular Approach. Aquatic microbial world and biodiversity: Molecular Approach to improve the knowledge* / E. Nardini, V. Kisand, T. Lettieri. – European Union, 2010. – 49 p.

99. Neufeld, J. D. Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age / J. D. Neufeld, M. Wagner, J. C. Murrell // *The ISME Journal*. – 2007. – V. 1. – I. 2. – P. 103–110.

100. Neufeld, J.D. Witnessing the last supper of uncultivated microbial cells with Raman-FISH / J. D. Neufeld, J. C. Murrell // *The ISME Journal*. – 2007. – V. 1. – I. 4. – P. 269–270.

101. Newton, R. J. A Guide to the natural history of freshwater lake bacteria / R. J. Newton, S. E. Jones, A. Eiler, K. D. McMahon, S. Bertilsson // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2011. – V. 75. – I. 1. – P. 14–49.

102. Nocker, A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review / A. Nocker, M. Burr, A. K. Camper // *Microbial Ecology*. – 2007. – V. 54. – I. 2. – P. 276–289.

103. Nyström, T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death / T. Nyström // *Archives of Microbiology*. – 2001. – V. 176. – I. 3. – P. 159–164.

104. Olson, D. M. Terrestrial ecoregions of the world: a new map of life on Earth A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity / D. M. Olson, E. Dinerstein, E. D. Wikramanayake, N. D. Burgess, G. V. N. Powell, E. C. Underwood, J. A. D'amico, I. Itoua, H. E. Strand, J. C. Morrison, C. J. Loucks, T. F. Allnutt, T. H. Ricketts, Y. Kura, J. F. Lamoreux, W. W. Wettengel, P. Hedao, K. R. Kassem // *BioScience*. – 2001. – P. 51. – I. 11. – P. 933–938.

105. Ouverney, C. C. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types

*in situ* / C. C. Ouverney, J. A. Fuhrman // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65. – I. 4. – P. 1746–1752.

106. Øvreås, L. Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms / L. Øvreås, D. Bourne, R. Sandaa, E. O. Casamayor, S. Benlloch, V. Goddard, G. Smerdon, M. Heldal, T. F. Thingstad // Aquatic Microbial Ecology. – 2003. – V. 31. – I. 2. – P.109–121.

107. Perez, M.T. Major shift in bacterioplankton utilization of enantiomeric amino acids between surface waters and the ocean's interior / M. T. Perez, C. Pausz, G. J. Herndl // Limnology and Oceanography. – 2003. – V. 48. – I. 2. – P. 755–763.

108. Pernthaler, A. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria / A. Pernthaler, J. Pernthaler, R. Amann // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – V. 68. – I. 6. – P. 3094–3101.

109. Pernthaler, J. Fate of heterotrophic microbes in pelagic habitats: focus on populations / J. Pernthaler, R. Amann // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2005. – V. 69. – I. 3. – P. 440–461.

110. Pommier, T. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton / T. Pommier, B. Canbäck, L. Riemann, K. H. Boström, K. Simu, P. Lundberg, A. Tunlid, A. Hagström // Molecular Ecology. – 2007. – V. 16. – I. 4. – P. 867–880.

111. Poretsky, R. S. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples / R. S. Poretsky, N. Bano, A. Buchan, G. LeCleir, J. Kleikemper, M. Pickering, W. M. Pate, M. A. Moran, J. T. Hollibaugh // Applied and Environmental Microbiology. – 2005. – V. 71. – I. 7. – P. 4121–4126.

112. Radajewski, S. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology / S. Radajewski, P. Ineson, N. R. Parekh, J. C. Murrell // Nature. – 2000. – V. 403. – I. 6770. – P. 646–649.

113. Rosenstock, B. Sources and sinks of dissolved free amino acids and protein in a large and deep mesotrophic lake / B. Rosenstock, M. Simon // *Limnology and Oceanography*. – 2001. – V. 46. – I. 3. – P. 644–654.
114. Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual* / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – 198 p.
115. Schäfer, H. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations / H. Schäfer, L. Bernard, C. Courties, P. Lebaron, P. Servais, R. Pukall, E. Stackebrandt, M. Troussellier, T. Guindulain, J. Vives-Rego, G. Muyzer // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2001. – V. 34. – I. 3. – P. 243–253.
116. Schauer, M. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting / M. Schauer, R. Massana, C. Pedrós-Alió // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2000. – V. 33. – I. 1. – P. 51–59.
117. Schneider, T. Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities / T. Schneider, K. Riedel // *PROTEOMICS*. – 2010. – V. 10. – I. 4. – P. 785–798.
118. Schramm, A. *In situ* analysis of structure and activity of the nitrifying community in biofilms, aggregates, and sediments / A. Schramm // *Geomicrobiology Journal*. – 2003. – V. 20. – I. 4. – P. 313–333.
119. Schultz, J. G. E. Bacterial diversity in a large, temperate, heavily modified river, as determined by pyrosequencing / J. G. E. Schultz, J. J. Kovatch, E. M. Anneken // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2013. – V. 70. – I. 2. – P. 169–179.
120. Schuster, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology / S. C. Schuster // *Nature Methods*. – 2008. – V. 5. – I. 1. – P. 16–18.
121. Sharkey, F. H. Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology / F. H. Sharkey, I. M. Banat, R. Marchant // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2004. – V. 70. – I. 7. – P. 3795–3806.

122. Shaw, A. K. It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities / A. K. Shaw, A. L. Halpern, K. Beeson, B. Tran, J. C. Venter, J. B. H. Martiny // *Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 10. – I. 9. – P. 2200–2210.
123. Shokralla, S. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research / S. Shokralla, J. L. Spall, J. F. Gibson, M. Hajibabaei // *Molecular Ecology*. – 2012. – V. 21. – I. 8. – P. 1794–1805.
124. Spring, S. *Limnobacter thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a novel thiosulfate-oxidizing bacterium isolated from freshwater lake sediment / S. Spring, P. Kampfer, K. H. Schleifer // *The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2001. – V. 51. – Pt. 4. – P. 1463–1470.
125. Stahl, D. A. High-throughput techniques for analyzing complex bacterial communities / D. A. Stahl // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2004. – V. 547. – P. 5–17.
126. Staley, C. Application of Illumina next-generation sequencing to characterize the bacterial community of the Upper Mississippi River / C. Staley, T. Unno, T. J. Gould, B. Jarvis, J. Phillips, J. B. Cotner, M. J. Sadowsky // *Journal of Applied Microbiology*. – 2013. – V. 115. – I. 5. – P. 1147–1158.
127. Suzuki, M. T. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample / M. T. Suzuki, M. S. Rappé, Z. W. Haimberger, H. Winfield, N. Adair, J. Ströbel, S. J. Giovannoni // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1997. – V. 63. – I. 3. – P. 983–989.
128. Tamaoka, J. Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas* / J. Tamaoka, D.-M. Ha, K. Komagata // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1987. – V. 37. – I. 1. – P. 52–59.

129. Tang, J. Microbial Metabolomics / J. Tang // *Current Genomics*. – 2011. – V. 12. – I. 6. – P. 391–403.
130. Tien, C.-J. Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilm community structure / C.-J. Tien, M.-C. Lin, W.-H. Chiu, C. S. Chen // *Environmental Pollution*. – 2013. – V. 179. – P. 95–104.
131. Treude, T. Consumption of methane and CO<sub>2</sub> by methanotrophic microbial mats from gas seeps of the anoxic Black Sea / T. Treude, V. Orphan, K. Knittel, A. Gieseke, C. H. House, A. Boetius // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2007. – V. 73. – I. 7. – P. 2271–2283.
132. Trusova, M. Y. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequence / M. Y. Trusova, M. I. Gladyshev // *Microbial Ecology*. – 2002. – V. 44. – I. 3. – P. 252–259.
133. Vargas, C. A. Bacterial production along a river-to-ocean continuum in central Chile: implications for organic matter cycling / C. A. Vargas, L. Arriagada, M. Sobarzo, P. Y. Contreras, G. Saldas // *Aquatic Microbial Ecology*. – 2013. – V. 68. – I. 3. – P. 195–213.
134. Vázquez-Baeza, Y. EMPeror: a tool for visualizing high-throughput microbial community data / Y. Vázquez-Baeza, M. Pirrung, A. Gonzalez, R. Knight // *GigaScience*. – 2013. – V. 2. – I. 1. – P. 16.
135. Volova, T. G. Degradation of polyhydroxyalkanoates in eutrophic reservoir / T. G. Volova, M. I. Gladyshev, M. Y. Trusova, N. O. Zhila // *Polymer Degradation and Stability*. – 2007. – V. 92. – I. 4. – P. 580–586.
136. Wang, Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies / Y. Wang, P.-Y. Qian // *PLoS ONE*. – 2009. – V. 4. – I. 10. – e7401. doi:10.1371/journal.pone.0007401

137. Ward, B. B. Molecular Approaches to Marine Microbial Ecology and the Marine Nitrogen Cycle / B. B. Ward // Annual Review of Earth and Planetary Sciences. – 2005. – V. 33. – I. 1. – P. 301–333.

138. Watanabe, K. Ecological niche separation in the *Polynucleobacter* subclusters linked to quality of dissolved organic matter: a demonstration using a high sensitivity cultivation-based approach / K. Watanabe, N. Komatsu, T. Kitamura, Y. Ishii, H. D. Park, R. Miyata, N. Noda, Y. Sekiguchi, T. Satou, M. Watanabe, S. Yamamura, A. Imai, S. Hayashi // Environmental Microbiology. – 2012. – V. 14. – I. 9. – P. 2511–2525.

139. Weiss, M. Consumption of labile dissolved organic matter by limnetic bacterioplankton: the relative significance of amino acids and carbohydrates / M. Weiss, M. Simon // Aquatic Microbial Ecology. – 1999. – V. 17. – I. 1. – P. 1–12.

140. White, D. C. Chemical Ecology: possible linkage between Macro- and Microbial Ecology / D. C. White // Oikos. – 1995. – V. 74. – I. 2. – P. 177.

141. Wilmes, P. Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems / P. Wilmes, P. L. Bond // Trends in Microbiology. – 2006. – V. 14. – I. 2. – P. 92–97.

142. Yan, Q. Metagenome-based analysis: A promising direction for plankton ecological studies / Q. Yan, Y. Yu // Science China Life Sciences. – 2011. – V. 54. – I. 1. – P. 75–81.

143. Yokokawa, T. Linking bacterial community structure to carbon fluxes in marine environments / T. Yokokawa, T. Nagata // Journal of Oceanography. – 2010. – V. 66. – I. 1. – P. 1–12.

144. Zajec, N. Distinct approaches for the detection and removal of chimeric 16S rRNA sequences can significantly affect the outcome of between-site comparisons / N. Zajec, B. Stres, G. Avgutin // Aquatic Microbial Ecology. – 2012. – V. 66. – I. 1. – P. 13–21.

145. Zehr, J. P. Microbes in Earth's aqueous environments / J. P. Zehr // Frontiers in Microbiology. – 2010. – V. 1. doi: 10.3389/fmicb.2010.00004

146. Zubkov, M. V. Differential microbial uptake of dissolved amino acids and amino sugars in surface waters of the Atlantic Ocean / M.V. Zubkov, G. A. Tarran, I. Mary, B. M. Fuchs // *Journal of Plankton Research*. – 2008. – V. 30. – I. 2. – P. 211–220.