

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

РАЗНООБРАЗИЕ ДЕНИТРИФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ
В БИОПЛЕНКАХ, СФОРМИРОВАННЫХ НА КАМЕНИСТЫХ
СУБСТРАТАХ В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ

© 2020 г. Г. В. Подлесная^{а, *}, С. А. Потапов^а, А. Ю. Краснопеев^а, Ю. Р. Штыкова^а,
И. В. Томберг^а, О. А. Тимошкин^а, О. И. Белых^а

^аЛимнологический институт СО РАН, Иркутск, 664033 Россия

*e-mail: podlesnaya@lin.irk.ru

Поступила в редакцию 24.07.2019 г.

После доработки 29.10.2019 г.

Принята к публикации 01.11.2019 г.

Денитрификация – главный биологический процесс восстановления нитратов до молекулярного азота (N₂). Впервые показано присутствие денитрифицирующих бактерий *nirK*-типа в эпиплитических биопленках литоральной зоны озера Байкал. Выявлено, что наибольшее видовое богатство характерно для микробных сообществ биопленок, отобранных в районе пос. Большое Голоустное и вблизи г. Северобайкальск, наименьшее – в районе пос. Листвянка. Филогенетический анализ показал, что для всех клонированных последовательностей ближайшими родственниками являются некультивируемые денитрифицирующие бактерии из разных местообитаний. Близкородственные культивируемые гомологи представлены последовательностями, принадлежащими порядкам *Rhizobiales* и *Rhodobacterales* класса *Alphaproteobacteria*.

Ключевые слова: круговорот азота, денитрифицирующие бактерии, ген *nirK*, эпиплитические биопленки, оз. Байкал

DOI: 10.31857/S0026365620030143

Денитрификация – процесс восстановления нитрата до газообразного азота через образование нитрита, оксида азота и закиси азота (Zumft, 1997). В водных экосистемах бактериальная денитрификация служит основным способом удаления соединений азота, что определяет ключевое значение этого процесса в поддержании стабильных гидрхимических показателей и, в целом, трофического статуса водоемов (Кузнецов, 1985). В последние годы на оз. Байкал наблюдается “экологический кризис”, характеризующийся крупномасштабными изменениями состава, численности и структуры сообществ гидробионтов, вызванный, очевидно, эвтрофированием водоема (Timoshkin et al., 2018). Микробные сообщества биопленок, сформированных на каменистых субстратах в прибрежной зоне озера, также реагируют на любые изменения среды обитания и служат индикаторами уровня антропогенной нагрузки на экосистему Байкала (Суслова и соавт., 2018).

Цель данной работы – изучить разнообразие денитрифицирующих бактерий в биопленках твердых субстратов в литоральной зоне оз. Байкал с помощью маркеров к гену *nirK*, кодирующему медьсодержащую нитритредуктазу.

Пробы биопленок отобраны с поверхности камней в прибрежной зоне оз. Байкал в 2017 году

(табл. 1). Определение физико-химических характеристик воды в местах отбора проб биопленок проводили, как ранее описано (Galachyants et al., 2018). Суммарную ДНК образцов выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Фрагмент гена *nirK* амплифицировали с помощью праймеров F1aCu и R3Cu (Hallin, Lindgren, 1999). Полученные нуклеотидные последовательности фрагмента гена *nirK* депонированы в базу данных GenBank под номерами MK460600–MK460761. Поиск гомологичных последовательностей выполняли, используя BLASTX-анализ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Аминокислотные последовательности, сходные более чем на 95%, объединяли в группы (операционные таксономические единицы, ОТЕ). Индексы биоразнообразия рассчитывали на основе ОТЕ в программе Mothur 1.39.5 (<http://www.mothur.org>). Древо аминокислотных последовательностей конструировали, применяя Байесовский анализ с помощью программы MrBayes (v. 3.2.6) (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). На основе аминокислотных последовательностей получали матрицу дистанций метрикой UniFrac с последующим использованием иерархического кластерного анализа (hclust) (Murtagh, 1992) методом UPGMA, применяя пакеты phyloseq (v. 1.21.0) и phangorn (v. 2.2.0), реализованные в программе R (v. 3.2.4).

Таблица 1. Физико-химические свойства придонной воды в местах отбора проб биопленок

Проба	Станция, глубина	Координаты	Дата	T, °C	pH	NH ₄ ⁺ , мг/л	NO ₂ ⁻ , мг/л	NO ₃ ⁻ , мг/л	PO ₄ ³⁻ , мг/л	TN, мг/л	ТОС, мг С/л
G5	Б. Голоустное, 15 м	52°1'36.5" N 105°24'11.8" E	08.2017	8.0	—	0.008	0.003	0.37	0.038	0.44	1.6
G6	Б. Ая, 15 м	52°49'49.86" N 106°42'13.38" E	08.2017	7.1	—	0.006	0.005	0.05	0.043	0.47	1.5
G7	Листвянка, 1 м	51°50'41.92" N 104°52'31.04" E	06.2017	8.3	8.05	0.02	0.003	0.21	0.012	—	—
G8	1 м	51°50'41.92" N 104°52'31.04" E	09.2017	8.1	8.09	0.005	0.004	0.08	0.028	0.42	2.1
G9	Северобайкальск, 1 м	55°37'49.8" N 109°21'1.7" E	06.2017	9.1	8.60	0.00	0.002	0.07	0.005	—	—
G10	1 м	55°37'49.8" N 109°21'1.7" E	09.2017	7.5	8.40	0.005	0.004	0.14	0.035	0.33	2.0

Примечание. TN – общий азот, ТОС – общий органический углерод.

Таблица 2. Богатство и разнообразие последовательностей гена *nirK* в биопленках литорали оз. Байкал

Образец	Количество последовательностей	Количество ОТЕ	Покрывание, %	Индексы разнообразия			
				ACE	Chao1	Шеннона	обратный Симпсона
G5	19	10	63.2	24.2	31.0	2.06	6.33
G6	42	7	90.5	19.5	10.0	1.12	2.16
G7	25	8	84.0	14.3	10.0	1.59	3.45
G8	31	6	90.3	9.7	7.5	0.96	1.76
G9	32	11	75.0	31.0	20.3	1.51	2.46
G10	21	10	85.7	11.7	10.6	2.20	8.32

Физико-химические показатели придонной воды, окружающей субстраты с биопленками, представлены в табл. 1. Всего проанализировано 170 аминокислотных последовательностей гена *nirK* (табл. 2). BLASTx-анализ показал, что для всех клонированных последовательностей ближайшими родственниками преимущественно были некультивируемые денитрифицирующие бактерии из разных местообитаний со сходством от 78 до 100%. Только две последовательности пробы G8 были идентичны с таковыми штамма *Ochrobactrum* sp. ЗСВ4. Наибольшим видовым богатством, согласно индексам разнообразия, отличались образцы G5 (пос. Большое Голоустное), G9 и G10 (г. Северобайкальск); наименьшим – проба G8 (пос. Листвянка) (табл. 2). Состав последовательностей гена *nirK* и их относительное обилие различались между пробами с разных станций. ОТЕ 1, включающая наибольшее количество последовательностей (90), доминировала во всех образцах биопленок, кроме G5, где преобладала ОТЕ 2. ОТЕ 2, содержащая 14 последовательностей, также найдена во всех образцах, за исключением G8. Кроме того, еще 7 ОТЕ обнаружены более чем в одном образце, а 25 ОТЕ только в одной пробе, 18 из которых были представлены единичной последовательностью гена *nirK*. Древо последовательностей всех проб биопленок,

сгруппированных в 35 ОТЕ, и родственных последовательностей из GenBank демонстрирует, что клонированные последовательности фрагмента гена *nirK* распределились в четыре кластера (рис. 1). Кластер I содержит ОТЕ с низким сходством с последовательностями из GenBank. Так, ОТЕ 7, 19, 23, 24, 27, 28 и 32 на 78, 93, 90, 82, 89, 87 и 93% соответственно сходны с последовательностями из устья Желтой реки, оз. Плюсеее и почвы. Большая же часть последовательностей (151) объединилась в кластер IV: 79% из образца G5, 98% – G6, 84% – G7, 97% – G8, 94% – G9 и 67% – G10.

Ближайшими родственниками для данных последовательностей были штаммы порядков *Rhodobacterales* и *Rhizobiales* и некультивируемые бактерии из различных местообитаний: биопленки олиготрофных озер в Пиренеях (Vila-Costa et al., 2014), прибрежные микробные маты, вода–осадки мезотрофного оз. Шохзее и водная толща эвтрофного оз. Плюсеее (Kim et al., 2011), осадки эвтрофных озер Дунху (Hou et al., 2013) и Геху, водная толща (Li et al., 2014) и осадки устья Желтой реки, активный ил, почва. Очевидно, что столь широко распространенная группа бактерий играет весьма важную роль в осуществлении процесса денитрификации. Полученные нами результаты согласуются с данными исследования разнообразия денитрификаторов в других озерах. Так, большин-

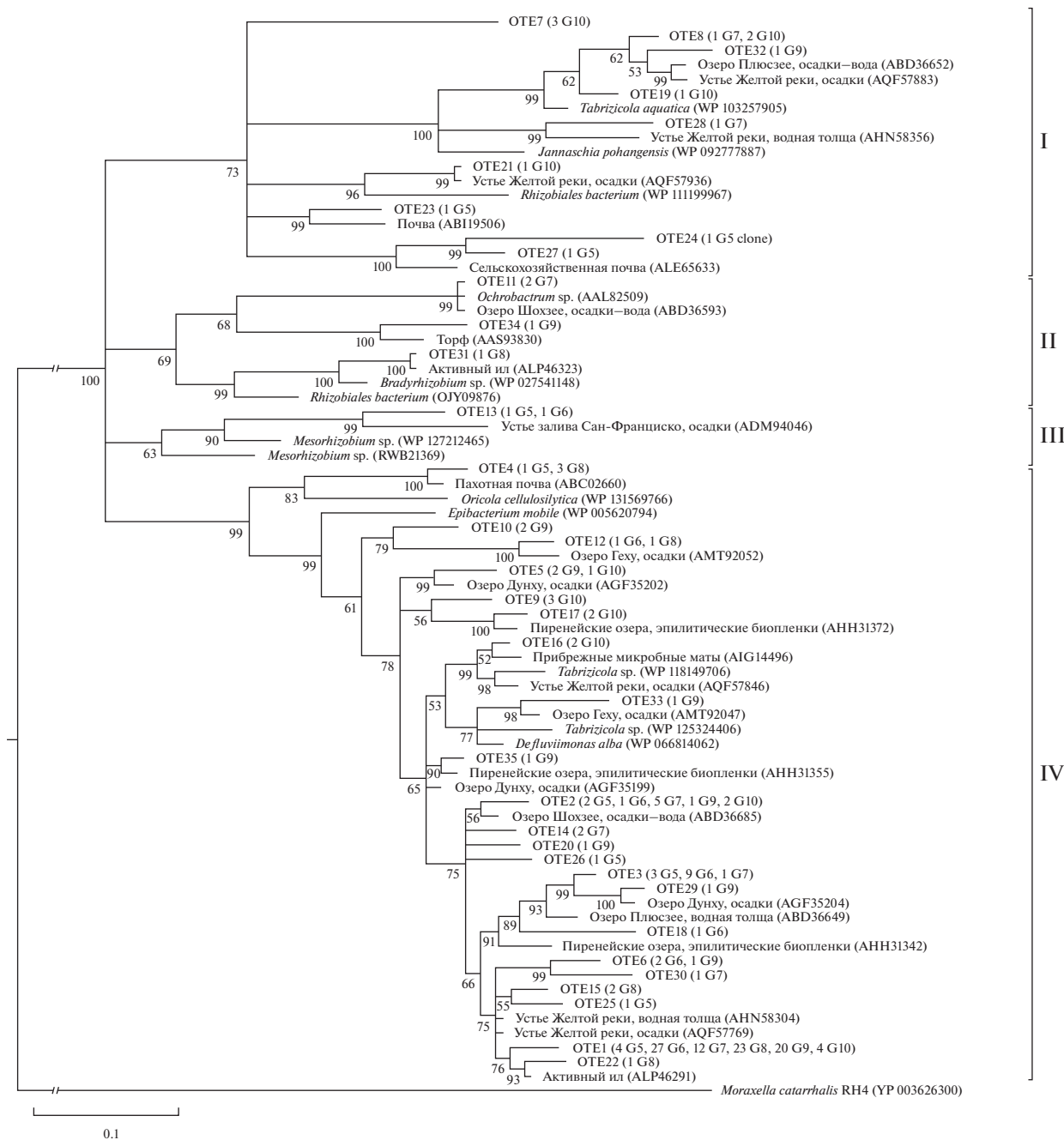


Рис. 1. Древо, построенное на основе аминокислотных последовательностей гена *nirK*, сгруппированных в ОТЕ. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 20 млн альтернативных деревьев. В качестве внешней группы использовали последовательность гена *aniA* из *Moraxella catarrhalis* (YP_003626300).

ство последовательностей гена *nirK* из эпилитических биопленок олиготрофных озер в Пиренеях принадлежали порядкам *Rhizobiales* и *Rhodobacterales* класса *Alphaproteobacteria* (Vila-Costa et al., 2014). Для осадков бореальных озер, расположенных в Финляндии, также показано, что основная доля последовательностей гена *nirK* принадлежит бактериям порядка *Rhizobiales* (Saarenheimo et al., 2015). Предположительно, в биопленках оз. Бай-

кал гены *nirK*-типа содержат не только *Alphaproteobacteria*, но и представители других филумов и классов. В последние годы на основе анализа полных геномов бактерий установлено, что гены *nirK* присутствуют в филах *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и т.д., при этом показано разделение последовательностей на две клады: первая, в основном, включает *Alphaproteobacteria* (и некоторые *Gamma*- и *Betaproteobacteria*), вторая содер-



Рис. 2. Дендрограмма *nirK*-сообществ, построенная с использованием иерархического кластерного анализа (hclust) методом UPGMA. Сообщества денитрификаторов из оз. Байкал выделены жирным шрифтом.

жит более разнообразные таксоны (Helen et al., 2016).

Иерархический кластерный анализ сообществ денитрификаторов из различных сред обитания демонстрирует формирование отдельных групп последовательностей в зависимости от физико-химических параметров окружающей среды (рис. 2). Байкальские последовательности группируются в отдельный кластер с последовательностями из воды, осадков и биопленок других озер. Стоит отметить, что последовательности из проб, отобранных с глубины 1 м в акваториях пос. Листвянка и г. Северобайкальск, объединились в один подкластер с последовательностями мезотрофных и эвтрофных озер. Выявленный факт может отражать последствия избыточного поступления биогенов в прибрежную зону озера, которые особенно ярко вы-

ражены на небольших глубинах вблизи населенных пунктов (Timoshkin et al., 2018).

Таким образом, в оз. Байкал впервые обнаружены денитрифицирующие бактерии, содержащие ген *nirK*, кодирующий медьсодержащую нитритредуктазу. Денитрифицирующие бактерии *nirK*-типа в биопленках на каменистых субстратах представлены классом *Alphaproteobacteria*. Благодаря наличию и разнообразию бактерий данной функциональной группы показана потенциальная способность бактериальных сообществ озера к удалению нитратной и нитритной форм азота, что подтверждается гидрохимическими данными, согласно которым трофический статус озера в настоящее время определяется как олиготрофный.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы № 0345-2019-0003 (АААА-А16-116122110061-6) “Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем...”. Сбор материала для исследования частично поддержан проектом № 0345-2019-0009 (АААА-А16-116122110067-8) “Крупномасштабные изменения в экологии и биоразнообразии сообществ...”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо материалов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Кузнецов С.И., Саралов А.И., Назина Т.Н. Микробиологические процессы круговорота углерода и азота в озерах. М.: Наука, 1985. 213 с.
 Сулова М.Ю., Пестунова О.С., Суханова Е.В., Штыкова Ю.Р., Косторнова Т.Я., Ханаев И.В., Сакирко М.В., Парфенова В.В. Роль культивируемых микроорганизмов биопленок каменистых субстратов в системе самоочищения озера Байкал // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 718–726.
 Suslova M.Yu., Pestunova O.S., Sukhanova E.V., Shtykova Yu.R., Kostornova T.Ya., Khanaev I.V., Sakirko M.V., Parfenova V.V. Role of cultured microorganisms from biofilms formed on rocky substrates in the lake Baikal self-purification system // Microbiology (Moscow). V. 87. P. 788–795.
 Galachyants A.D., Tomberg I.V., Sukhanova E.V., Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Zimens E.A., Blinov V.V., Sakirko M.V., Domysheva V.M., Belykh O.I. Bacterioneuston in Lake Baikal:

abundance, spatial and temporal distribution // Int. J. Environ. Res. Publ. Health. 2018. V. 15. Article 2587.

Helen D., Kim H., Tytgat B., Anne W. Highly diverse *nirK* genes comprise two major clades that harbour ammonium-producing denitrifiers // BMC Genomics. 2016. V. 17. Article 155.

<https://doi.org/10.1186/s12864-016-2465-0>

Hou J., Cao X.Y., Song C.L., Zhou Y.Y. Predominance of ammonia-oxidizing archaea and *nirK*-gene-bearing denitrifiers among ammonia-oxidizing and denitrifying populations in sediments of a large urban eutrophic lake (Lake Donghu) // Can. J. Microbiol. 2013. V. 59. P. 456–464.

Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // Bioinformatics. 2001. V. 17. P. 754–755.

Kim O.-S., Imhoff J.F., Witzel K.-P., Junier P. Distribution of denitrifying bacterial communities in the stratified water column and sediment–water interface in two freshwater lakes and the Baltic Sea // Aquat. Ecol. 2011. V. 45. P. 99–112.

Li J., Wei G., Wang N., Gao Z. Diversity and distribution of *nirK*-harboring denitrifying bacteria in the water column in the Yellow River estuary // Microbes Environ. 2014. V. 29. P. 107–110.

Murtagh F. Comments on “Parallel algorithms for hierarchical clustering and cluster validity” // IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. 1992. V. 14. P. 1056–1057.

Saarenheimo J., Tirola M.A., Rissanen A.J. Functional gene pyrosequencing reveals core proteobacterial denitrifiers in boreal lakes // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Article 674.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00674>

Timoshkin O.A. Coastal zone of the world’s great lakes as a target field for interdisciplinary research and ecosystem monitoring: Lake Baikal (East Siberia) // Limnology and Freshwater Biology. 2018. № 1. P. 81–97.

Vila-Costa M., Bartrons M., Catalan J., Casamayor E.O. Nitrogen-cycling genes in epilithic biofilms of oligotrophic high-altitude lakes (Central Pyrenees, Spain) // Microb. Ecol. 2014. V. 68. P. 60–69.

Zumft W.G. Cell biology and molecular basis of denitrification // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1997. V. 61. P. 533–616.

Diversity of Denitrifying Bacteria in Biofilms Formed on Stony Substrates of the Lake Baikal Littoral Zone

G. V. Podlesnaya¹*, S. A. Potapov¹, A. Yu. Krasnopeev¹, Yu. R. Shtykova¹, I. V. Tomberg¹, O. A. Timoshkin¹, And O. I. Belykh¹

¹limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

*e-mail: podlesnaya@lin.irk.ru

Abstract—Denitrification is the major process of nitrate reduction to dinitrogen (N₂). This is the first report on detection of the *nirK* type denitrifying bacteria in the epilithic biofilms of the Lake Baikal littoral zone. The highest species diversity was revealed in microbial communities of the biofilms collected in the area of the bol’shoe goloustnoe settlement and severobaikal’sk city, while those collected in the vicinity of listvyanka settlement exhibited the lowest diversity. Phylogenetic analysis showed uncultured denitrifying bacteria from diverse habitats were most closely related to all cloned sequences. the closely related homologs were represented by the sequences of the orders *Rhizobiales* and *Rhodobacterales*, class *Alphaproteobacteria*.

Keywords: nitrogen cycle, denitrifying bacteria, the *nirK* gene, epilithic biofilms, Lake Baikal