

ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И РАЗМЕРНО- МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА БАКТЕРИОПЛАНКТОНА РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

© 2021 г. Е. В. Кузнецова^{а, *}, Е. В. Суханова^б, Д. Б. Косолапов^{а, с}

^аИнститут биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук,
Борок, Некоузский район, Ярославская область, 152742 Россия

^бЛимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, 664033 Россия

^сЧереповецкий государственный университет, Череповец, Вологодская область, 162600 Россия

*e-mail: elivic.rum@gmail.com

Поступила в редакцию 30.12.2020 г.

После доработки 20.01.2021 г.

Принята к публикации 27.01.2021 г.

Впервые с помощью молекулярно-биологических методов изучен таксономический состав бактериопланктона Рыбинского водохранилища. Получены 58 нуклеотидных последовательностей, которые отнесены к 26 операционным таксономическим единицам (ОТЕ): *Eubacterium* (24 ОТЕ) и *Eukaryota* (2 ОТЕ). Разнообразие бактериопланктона представлено семью филумами зубактерий: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria*. Доминирующими отмечены альфапротеобактерии вида *Candidatus Fonsibacter ubiquis*, а также неидентифицированные представители филумов *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*, гомологи которых широко распространены в пресных водоемах и имеют маленькие размеры геномов и клеток. В период проведения исследований в бактериопланктоне преобладали (70–99%) одиночные мелко- и среднеразмерные клетки, наименее уязвимые для элиминирующих факторов контроля “сверху” и “снизу”. Основу численности бактериального сообщества составляли кокки (50–80%), тогда как значительная доля его биомассы приходилась на мелкие палочки (длиной до 2 мкм) (20–30%).

Ключевые слова: бактериальное сообщество, филогенетический анализ, 16S рРНК, секвенирование по Сэнгеру, таксономический состав, размерно-морфологическая структура

DOI: 10.31857/S0026365621030083

Рыбинское водохранилище — это крупное (4550 км²) равнинное мелководное (средняя глубина 5.6 м) эвтрофное (хлорофилл *a* — до 40 мкг/л) водохранилище озерного типа (Верхняя Волга). Оно образовано в 1940–1949 гг. и состоит из четырех плесов Центрального, Волжского, Моложского и Шекснинского (Романенко, 1985; Минеева, Макарова, 2018). Регулярные гидрологические, гидрохимические и гидробиологические исследования проводятся на этой сетке станций с конца 1950-х гг. (Романенко, 1985). В результате этих исследований, в частности, выявлены закономерности пространственного распространения и временной динамики бактериопланктона. В годовом цикле в пелагиали водоема наблюдаются два максимума количественного развития бактериопланктона — в конце весны и в конце лета—начале осени (Романенко, 1985; Копылов, Косолапов, 2008).

Таксономическое разнообразие бактериопланктона водохранилищ обычно выше по срав-

нению с озерными и речными экосистемами (Пиев et al., 2017; Qu et al., 2018), причем оно увеличивается вдоль продольного профиля к приплотинной части водохранилищ (Simek et al., 2008; Wei et al., 2014). Доминирующими филумами в водохранилищах, как и в большинстве других пресных водоемов, являются *Proteobacteria*, *Actinobacteria* и *Bacteroidetes*, доля которых в общем количестве бактериопланктона может достигать 95% (Пиев et al., 2017). Кроме того, высоким разнообразием и обилием характеризуются филумы *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Acidobacteria* и *Cyanobacteria* (Polverino et al., 2012; Qu et al., 2018; Кузнецова и соавт., 2020a). Разные филы бактерий по-разному реагируют на зарегулирование рек, например, пространственное распределение *Cyanobacteria* не изменяется, а распределение *Betaproteobacteria* и *Gammaaproteobacteria* претерпевает значительные изменения (Ruiz-Gonzalez et al., 2013). В формировании структуры бактериопланктона водохранилищ участвуют

абиотические и биотические факторы, такие как температура, концентрация растворенного кислорода, фосфора, неорганического и общего азота, электропроводность и pH воды (Ruiz-Gonzalez et al., 2013; Wei et al., 2014; Yang et al., 2015; Qu et al., 2018). Важную роль играют также прижизненные выделения фитопланктона, выедание протистами и лизис вирусами (Simek et al., 2008).

До сих пор изучение видового состава бактериопланктона Рыбинского водохранилища проводили традиционными культуральными методами. С помощью этих методов определяли также численность физиологических групп микроорганизмов: сапрофитных, нитрифицирующих, денитрифицирующих, амилотических, целлюлозо- и нефтеразлагающих и др. (Романенко, 1985; Романенко и соавт., 1990). Молекулярно-генетические методы использовали для характеристики эпифитных бактериальных сообществ водохранилища, в составе которых в вегетационный период доминировали два филума: *Cyanobacteria* и *Proteobacteria* (Рыбакова и соавт., 2009). При этом изучением микробных сообществ других водоемов занимается множество отечественных авторов (например, Раднагуруева и соавт., 2016; Tsydenova et al., 2018).

Исследование размерно-морфологической структуры бактериопланктона особенно ценно во взаимосвязи с его таксономическим составом. Важно охарактеризовать динамику как генетической, так и фенотической составляющих клеток бактерий. Бактериопланктон функционирует в условиях “функциональной избыточности”, поэтому определяющим критерием генетического обеспечения его регуляции становится способность к накоплению биомассы во взаимосвязи со скоростью метаболизма и частотой размножения (Кузнецова и соавт., 2020б).

Цель работы – с помощью метода секвенирования по Сэнгеру и эпифлуоресцентной микроскопии изучить таксономическую и размерно-морфологическую структуру бактериопланктона Рыбинского водохранилища.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Пробы воды отбирали 7 июля 2014 г. на стандартных станциях, расположенных в Волжском (Коприно и Молога) и Центральном (Наволоки, Измайлово, Средний Двор и Брейтово) плесах Рыбинского водохранилища. Интегральные пробы получали, смешивая воду, отобранную с каждого метра водной толщи от поверхности до дна, плексигласовым батометром Рутнера. Для количественного учета бактерий, гетеротрофных нанофлагеллят (жгутиконосцев, ГНФ) и вирусных частиц 60 мл интегральной пробы воды помещали в стерильные флаконы и фиксировали формали-

ном, предварительно профильтрованным через мембранный фильтр с диаметром пор 0.2 мкм, до конечной концентрации 2%, хранили в темноте при 4°C и обрабатывали в лаборатории в течение месяца.

Микроскопия. Численность и размерно-морфологические группы бактериопланктона, ГНФ, а также количество вириопланктона определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии. Бактерии учитывали на черных ядерных фильтрах с диаметром пор 0.17 мкм (ОИЯИ, г. Дубна, Россия) с использованием флуорохрома DAPI (Porter, Feig, 1980). Фильтровали 2 мл образца. Препараты просматривали при увеличении $\times 1000$ под эпифлуоресцентном микроскопом Olympus BX51 (“Olympus”, Япония), соединенным с цифровой камерой ColorView III (“Olympus”, Япония), при освещении ультрафиолетовыми лучами. Изображение преобразовывали в цифровую форму с помощью программного обеспечения CellF и использовали для последующего подсчета и измерения бактериальных клеток различной морфологии. Объемы бактерий вычисляли с использованием значений длины и диаметра клеток по формуле объема цилиндра с закругленными концами или шара ($W = L$): $V = (\pi/4) \times W^2 \times (L - (W/3))$, где V – объем клетки, W – ее диаметр и L – ее длина (Krambeck et al., 1981). Сырую биомассу микроорганизмов получали путем умножения их численности на средний объем клеток.

Численность и размеры ГНФ определяли с использованием флуорохрома примулин (Caron, 1983). Численность планктонных вирусных частиц (вириопланктона) определяли с использованием флуорохрома SYBR Green I (Noble, Fuhrman, 1998).

Первичную продукцию фитопланктона и темную ассимиляцию CO₂ определяли радиоуглеродным методом в интегральных пробах воды от поверхности до глубины тройной прозрачности по диску Секки и от поверхности до дна, соответственно (Романенко, 1985).

Молекулярно-генетические методы. Изучение таксономического разнообразия бактериопланктона проводили на стандартной станции Молога, расположенной в Волжском плесе Рыбинского водохранилища на бывшем русле р. Молога в месте ее впадения в р. Волга. Этот глубоководный участок характеризуется высокой продуктивностью и богатством фито- и зоопланктона (Романенко, 1985).

Интегральную пробу воды (800 мл) подвергали префильтрации через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 1.5 мкм (ОИЯИ, Дубна, Россия). Затем пробу воды концентрировали на нитроцеллюлозных фильтрах SterivexTM-GS (“Millipore”, США) с диаметром пор 0.22 мкм. Фильтры с биоматериалом фиксировали 80%-ным этиловым спиртом и хранили при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Выделение суммарной ДНК с фильтров проводили, используя комплект реагентов Ампли-Прайм® ДНК-сорб-В (“ИнтерЛабСервис”, Москва, Россия). ДНК элюировали и использовали в качестве матрицы в ПЦР на наборе Encyclo Plus PCR Kit (“Евроген”, Россия). В работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК бактерий (500L–1350R) (Денисова и соавт., 1999).

Лигирование ампликонов осуществляли с помощью набора Clone JET™ PCR Cloning Kit (“Fermentas”, Литва) по прилагаемой инструкции. Подготовку компетентных клеток штамма *E. coli* DH5α и трансформацию проводили, используя стандартные методики (Sambrook et al., 1989). Сиквенсную реакцию вели с набором Big-Dye® Terminator (“Applied Biosystems”, США) согласно протоколу фирмы-производителя. В реакцию брали 10–20 нг ампликона и 3–5 пмоль праймера. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (“Applied Biosystems”, США) в ГБУЗ “Областной онкологический диспансер” (Иркутск). Идентификацию проводили с помощью сравнительного анализа, используя он-лайн сервисы BLAST и FASTA. Выравнивание последовательностей и построение филогенетических деревьев проводили в программе MEGA v6.

Нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных, и им присвоены следующие номера (28 шт.): LT796232–LT796259.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В период проведения исследований глубина на стандартных станциях отбора проб в глубоководной части Рыбинского водохранилища находилась в пределах 5–12 м, температура поверхностного слоя воды составляла 18.7–22.2°C, придонного – 14.9–16.3°C. Прозрачность воды изменялась от 100 до 130 см и была ниже в Волжском плесе по сравнению с Центральным (табл. 1). Первичная продукция фитопланктона в период проведения исследований в Волжском плесе была ниже, чем в Центральном плесе: 352–669 и 462–1093 мг С/(м³ сут) соответственно (табл. 1). Однако в среднем за вегетационный сезон значение этого показателя максимальное на ст. Молога (Копылов и соавт., 2007). По-видимому, летнее развитие фитопланктона в начале июля начинается в центральной части водохранилища. Темновая ассимиляция CO₂ как интегральный показатель микробной активности, наоборот, была выше в Волжском плесе по сравнению с Центральным: 11.6–11.7 и 6.06–10.1 мг С/(м³ сут) соответственно (табл. 1).

Численность и биомасса ГНФ на ст. Молога достигали наибольших значений (5511×10^3 кл./мл)

и в среднем были выше в Волжском плесе по сравнению с Центральным. Численность вириопланктона на ст. Молога была ниже (55×10^6 частиц/мл), чем на ст. Коприно (77×10^6 частиц/мл), также расположенной в Волжском плесе. Отношение численности вирусов к численности бактерий на ст. Молога было в два раза ниже (7.8), чем на ст. Коприно (13.6), а также на других станциях, расположенных в Центральном плесе (табл. 1).

Численность и размерно-морфологическая структура бактериопланктона. Общая численность бактериопланктона изменялась в пределах $(4.4–7.8) \times 10^6$ кл./мл. На ст. Молога общая численность бактерий составила 7.0×10^6 кл./мл, средний объем клеток – 0.032 мкм³, биомасса – 224 мг/м³ (табл. 1). Биомасса бактериопланктона была меньше, чем на ст. Коприно Волжского плеса (336 мг/м³), но больше, чем на станциях Центрального плеса (127–188 мг/м³), за исключением ст. Брейтово (227 мг/м³).

В период проведения исследований основу бактериопланктона составляли мелкие и среднеразмерные клетки (табл. 2). Самые мелкие клетки (кокки) составляли большинство от численности бактериопланктона в восточной части Центрального плеса водохранилища: 63% (ст. Наволок) и 44% (ст. Измайлово). В западной части Центрального плеса, а также в Волжском плесе доминирование мелких кокков было менее значительным: 33% (ст. Брейтово) и 35% (ст. Молога) (табл. 2). В центральной части Центрального плеса и на речном участке Волжского плеса численно преобладали среднеразмерные кокки и коккобациллы: 37% (ст. Средний Двор) и 23% (ст. Коприно). Количество среднеразмерных кокков и коккобацилл, а также мелких палочек было примерно одинаковым на станциях Коприно, Наволок и Измайлово, тогда как на станциях Молога, Средний Двор и Брейтово была примерно одинаковой биомасса этих групп. Биомасса мелких палочек на всех станциях составляла 20–30% биомассы всего сообщества. Биомасса мелких и среднеразмерных кокков и коккобацилл была наиболее высокой на станциях Наволок и Средний Двор (более 60%), тогда как на остальных станциях она не превышала 50% общей биомассы бактериопланктона. На ст. Коприно в размерно-морфологической структуре бактериопланктона присутствовали крупные палочки, бактерии, агрегированные с детритом, а биомасса мелких и среднеразмерных кокков и коккобацилл составляла примерно 25% общей бактериальной биомассы (табл. 2).

Таксономическое разнообразие бактериопланктона. В результате молекулярно-генетического анализа бактериопланктона получено 58 нуклеотидных последовательностей, которые были отнесены к 26 операционным таксономическим единицам (ОТЕ) (табл. 3). Процент гомологии

Таблица 1. Гидрологические и микробиологические параметры воды на стандартных станциях Рыбинского водохранилища 07.07.2014

Параметры	Станции					
	Волжский плес		Центральный плес			
	Молога	Коприно	Наволоч	Измайлово	Средний Двор	Брейтово
Глубина, м	12	11	8	5	12	10
Прозрачность, см	100	100	120	130	110	110
$T_{\text{пов}}$, °С	20.4	18.7	18.7	19.5	19.1	22.2
$T_{\text{дно}}$, °С	14.9	15.7	16.0	16.3	15.5	16.0
$N_{\text{ВАС}}$, $\times 10^6$ кл./мл	6.99	5.69	7.80	5.62	4.39	5.98
$V_{\text{ВАС}}$, мкм ³	0.032	0.059	0.018	0.034	0.029	0.038
$B_{\text{ВАС}}$, мг С/м ³	61.2	86.3	55.0	57.8	41.5	67.0
N_{HNF} , $\times 10^3$ кл./мл	5511	4101	1922	3076	1538	2050
B_{HNF} , мг/м ³	435	398	209	289	92	127
N_{VIR} , $\times 10^6$ частиц/мл	54.7	77.2	76.9	70.5	88.0	47.9
$N_{\text{VIR}}/N_{\text{ВАС}}$	7.8	13.6	9.9	12.5	20.0	8.0
P_{PHY} , мг С/(м ³ сут)	669	352	1093	1034	882	462
DF CO ₂ , мг С/(м ³ сут)	11.7	11.6	10.1	6.93	6.27	6.06

Примечание. $T_{\text{пов}}$ и $T_{\text{дно}}$ – температура воды у поверхности и дна; $N_{\text{ВАС}}$, $V_{\text{ВАС}}$ и $B_{\text{ВАС}}$ – численность, средний объем клеток и биомасса бактериопланктона; N_{HNF} и B_{HNF} – численность и биомасса ГНФ; N_{VIR} – численность вириопланктона; P_{PHY} – первичная продукция фитопланктона; DF CO₂ – темновая ассимиляция CO₂.

Таблица 2. Вклад различных размерно-морфологических групп в формирование общей численности и биомассы в сообществе бактериопланктона на стандартных станциях в Рыбинском водохранилище в летний период (07.07.2014)

Группа бактерий	Доля в $N_{\text{ВАС}}$ или $B_{\text{ВАС}}$, %	Станции					
		Волжский плес		Центральный плес			
		Молога	Коприно	Наволоч	Измайлово	Ср. Двор	Брейтово
Мелкие кокки	$N/N_{\text{ВАС}}$	34.8	22.1	63.2	43.9	33.6	33.3
	$B/B_{\text{ВАС}}$	18.7	8.6	44.5	21.6	21.1	15.2
Среднеразмерные кокки и коккобациллы	$N/N_{\text{ВАС}}$	31.3	23.5	17.8	15.1	37.5	28.5
	$B/B_{\text{ВАС}}$	28.3	17.6	23.0	12.8	39.3	25.9
Крупные кокки	$N/N_{\text{ВАС}}$	0.0	2.1	1.0	0.8	1.0	1.6
	$B/B_{\text{ВАС}}$	0.0	6.1	3.7	2.2	2.6	3.8
Мелкие палочки	$N/N_{\text{ВАС}}$	20.9	23.5	16.8	15.9	24.0	17.9
	$B/B_{\text{ВАС}}$	28.4	21.8	26.9	23.8	30.5	21.8
Крупные палочки	$N/N_{\text{ВАС}}$	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
	$B/B_{\text{ВАС}}$	0.0	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0
Агрегированные	$N/N_{\text{ВАС}}$	13.0	28.7	1.3	24.3	3.9	18.7
	$B/B_{\text{ВАС}}$	24.6	44.3	2.0	40.0	6.5	33.3

Примечание. Мелкие кокки – диаметр >0.35 мкм, среднеразмерные кокки и коккобациллы – 0.35–0.5 мкм, крупные кокки – >0.5 мкм, мелкие палочки – длина >2 мкм, крупные палочки – длиной ≥ 2 мкм и агрегированные (ассоциированные с детритом) бактерии. $N_{\text{ВАС}}$ и $B_{\text{ВАС}}$ – общая численность и биомасса бактериопланктона; N и B – численность и биомасса его отдельных размерно-морфологических групп.

полученных последовательностей с идентифицируемыми представителями из баз данных варьировал в диапазоне значений 91–100%.

В результате сравнительного анализа идентифицировано семь филумов эубактерий: *Proteobacteria* (7 ОТЕ), *Bacteroidetes* (7 ОТЕ), *Verrucomicrobia* (4 ОТЕ), *Firmicutes* (3 ОТЕ), *Actinobacteria* (1 ОТЕ), *Gemmatimonadetes* (1 ОТЕ) и *Acidobacteria* (1 ОТЕ). Кроме того, определена хлоропластная ДНК гаптофитовых и криптофитовых водорослей (табл. 3). Доминирующими генотипами отмечены неидентифицируемые и некультивируемые представители филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Verrucomicrobia*.

На основании сравнительного и филогенетического анализа с последовательностями типовых штаммов с высоким процентом гомологии идентифицированы представители следующих родов: *Sphingobium* (*Alphaproteobacteria*), *Ferrigenium* (*Betaproteobacteria*), *Hafnia*, *Serratia* и *Yersinia* (*Gammaaproteobacteria*), *Bacillus*, *Leuconostoc* и *Sedimentibacter* (*Firmicutes*), *Flavobacterium*, *Algoriphagus*, *Sediminibacterium* и *Terrimonas* (*Bacteroidetes*) (табл. 3, рис. 1а, 1б). Кроме того, определены представители таких видов, как *Candidatus Fonsibacter ubiqus* (*Alphaproteobacteria*) и *Candidatus Nanopelagicus limnes* (*Actinobacteria*) (Neuenschwander et al., 2018; Tsementzi et al., 2019). Описание и идентификация данных организмов была сделана только на исследованиях их геномов.

На рис. 1а представлен филогенетический анализ представителей филума *Bacteroidetes*. Всего для этого филума получено четырнадцать последовательностей, который распределились на 7 ОТЕ. В классе *Flavobacteriia* последовательность ОТЕ 12 (клон Ворб-28) формирует кластер с ближайшими некультивируемыми гомологами в пределах рода *Flavobacterium*, гомология к которым составила 98%. Последовательность клона Ворб-52 (ОТЕ 13) образует кластер с последовательностями некультивируемых бактерий, при этом ближайшие последовательности типовых штаммов родов *Salinirepens*, *Fluviicola* и *Wandonia* с гомологией 93% образуют отдельные кластеры (рис. 1а, табл. 3). В классе *Cytophagia* последовательность ОТЕ 14 образует кластер с некультивируемыми бактериями в пределах рода *Algoriphagus* с высоким процентом гомологии (рис. 1а, табл. 3). В результате филогенетического анализа к классу *Chitinophagia* были отнесены четыре ОТЕ 15–18, которые формируют кластеры с последовательностями, полученными из других пресноводных экосистем, расположенных в различных географических зонах: водохранилище Греции и озер Китая, Швейцарии, Панамы. Однако только ОТЕ 17 и 18 можно определить на уровне рода как *Terrimonas* и *Sediminibacterium*, они находятся внутри кластеров типовых штаммов этих родов (рис. 1а). Очевидно, что

это могут быть новые виды в пределах описываемых родов.

Отдельная ветвь получена для ОТЕ 25 и 26, которые принадлежат хлоропластной ДНК фототрофных эукариот. ОТЕ 25 образовала кластер с гаптофитовыми одноклеточными водорослями *Chrysochromulina parva* (семь последовательностей) (рис. 1а, табл. 3). Две последовательности ОТЕ 26 с фотосинтезирующими одноклеточными эукариотическими криптофитовыми водорослями *Cryptomonas curvata* ССАР979/52.

Ветка *Alphaproteobacteria* включает в себя ОТЕ 1 и 2. Стоит отметить, что для ОТЕ 1 получено тринадцать последовательностей, которые имели гомологию 99.7% с последовательностью вида *Candidatus Fonsibacter ubiqus* (рис. 1а). Для ОТЕ 2 ближайшим гомологом является вид *Sphingobium hydrophobicum*, также с высокой гомологией.

Нуклеотидные последовательности клонов Ворб-26, Ворб-113 и Ворб-151 образовали три кластера в пределах филы *Firmicutes* и распределились в три рода: *Bacillus*, *Leuconostoc* и *Sedimentibacter* (рис. 1а).

На рис. 1б представлен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей клонов Ворб-16 и Ворб-137, которые относятся к представителям класса *Betaproteobacteria*. В результате анализа последовательность клона Ворб-16 распределилась в семейство *Comamonadaceae* с гомологией 98.8%, с такими родами как *Rhodofera*, *Variovorax*, *Limnohabitans* и *Curvibacter*. Последовательность клона Ворб-137 принадлежит классу *Gallionellaceae*, ближайшим культивируемым видом является *Ferrigenium kumadai* с гомологией 98.8%, которая относится к железooksисляющим бактериям.

ОТЕ 5–7 принадлежат классу *Gammaaproteobacteria*, которые в результате филогенетического анализа были распределены на три рода: *Hafnia*, *Serratia* (*Enterobacteriaceae*) и *Yersinia* (*Yersiniaceae*) (рис. 1б).

К филуму *Verrucomicrobia* были отнесены ОТЕ 20–23, которые распределились в три класса: *Opitutae*, *Terrimicrobia* и *Verrucomicrobiae*, ближайшие гомологи которых являются некультивируемыми бактериями (рис. 1б).

Для ОТЕ 11 ближайшим родственником является вид *Candidatus Nanopelagicus limnes* с гомологией 99.55% (*Actinobacteria*) (табл. 3). Последовательность 16S рРНК данного вида не использовали в филогенетическом анализе, т.к. в базе зарегистрирован его полный геном.

Нуклеотидные последовательности клонов Ворб-57 и Ворб-64 принадлежат филумам *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria* соответственно. Ближайшими гомологами являются некультивируемые бактерии с высокой гомологией (рис. 1б).

Таблица 3. Таксономический статус ближайших гомологов нуклеотидных последовательностей 16S рДНК, полученных из интегральной пробы воды ст. Молога (Рыбинское водохранилище) и размеры их клеток

Номер ОТЕ	Название клона	Номер в базе	Количество последовательностей	Ближайший гомолог, %	Таксономия	Размеры клеток, мкм
<i>Proteobacteria, Alphaproteobacteria</i>						
1	Вотб-7	LT796232	13	CP024034 <i>Candidatus Fonsibacter ubiquis</i> LSUCC0530, 99,78 JX448575 Uncultured bacterium clone BT3900DF_07G, 100 MT733969 <i>Sphingobium hydrophobicum</i> JZY5-15, 99.66	<i>Pelagibacteriales</i> , <i>Pelagibacteraceae</i> <i>Sphingomonadales</i> , <i>Sphingomonadaceae</i>	0.12–0.20 0.2–1.4 × 0.5–4.0
<i>Proteobacteria, Betaproteobacteria</i>						
3	Вотб-16	LT796234	1	HE814741 <i>Variovorax</i> sp. S2H12, 98.8 DQ535024 <i>Beta proteobacterium</i> LH10, 99.0	<i>Burkholderiales</i> , <i>Comamonadaceae</i>	0.5–0.6 × 1.2–3.0
4	Вотб-137	LT796235	1	LC065124.1 <i>Ferrigenium kumadaï</i> 98,32 JQ278768.1 Uncultured Rhodocyceae bacterium clone fjc-20, 98.77	<i>Nitrosomonadales</i> , <i>Gallionellaceae</i>	0.5–0.7 × 0.8–1.8
<i>Proteobacteria, Gammaproteobacteria</i>						
5	Вотб-2	LT796236	4	LR699008 <i>Hafnia alvei</i> MGYG-HGUT-0250, 100.0	<i>Enterobacteriales</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	1.0 × 2.0–5.0
6	Вотб-46	LT796237	1	KP318037 <i>Serratia</i> sp. LT10-MRL, 99.89	<i>Enterobacteriales</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	0.5–0.8 × 0.9–2.0
7	Вотб-149	LT796238	1	EU434503 <i>Yersinia kristensenii</i> b355, 99.9	<i>Enterobacteriales</i> , <i>Yersiniaceae</i>	0.5–0.8 × 1.0–2.0
<i>Firmicutes</i>						
<i>Bacilli, Bacillales, Bacillaceae</i>						
8	Вотб-26	LT796239	1	KC354637 <i>Bacillus fumarioli</i> , 99.8	<i>Bacilli, Bacillales</i> , <i>Bacillaceae</i>	0.6–0.7 × 1.2–3.0
9	Вотб-113	LT796240	1	EF059533 <i>Sedimentibacter</i> sp. JN18_V27_1, 96.6 FJ672111 Uncultured bacterium clone LI42-3B3, 98.3	<i>Tissierella</i>	0.35 × 7.0
10	Вотб-151	LT796241	1	KF149330 <i>Leuconostoc lactis</i> TMAU32662, 99.8	<i>Bacilli, Lactobacillales</i> , <i>Leuconostocaceae</i>	0.5–0.7 × 0.7–1.2
<i>Actinobacteria</i>						
<i>Actinobacteriales, Actinomycetales, Actinomycetaceae</i>						
11	Вотб-49	LT796242	1	CP016768 <i>Candidatus Nanopelagicus limnes</i> MMS-21-122, 99.55 JN869205.1 Uncultured bacterium clone NS01 99.66		0.4–0.5 × 1.2
<i>Bacteroidetes, Flavobacteriia, Flavobacteriales</i>						
12	Вотб-28	LT796243	2	KF499997 <i>Flavobacterium</i> sp., 98.4–98.6	<i>Flavobacteriaceae</i>	0.3–0.5 × 1.0–5.0
13	Вотб-52	LT796244	3	AB517714 <i>Salinirepens amamiensis</i> , 93.1–93.6 EU801372 Uncultured bacterium clone 3C002643, 99.9	<i>Cryomorphaceae</i>	0.3–0.8 × 1.0
<i>Bacteroidetes, Cytophagia, Cytophagales</i>						
14	Вотб-21	LT796245	1	AB682160 <i>Algoriphagus aquatilis</i> NBRC 104237, 98.99 AJ697704 uncultured <i>Sphingobacteriales</i> bacterium clone SF68, 100	<i>Cyclobacteriaceae</i>	0.2–0.4 × 1.6–4.0

Таблица 3. Окончание

Номер ОТЕ	Название клона	Номер в базе	Количество последовательностей	Ближайший гомолог, %	Таксономия	Размеры клеток, мкм
<i>Bacteroidetes, Chitinophagia, Chitinophagales, Chitinophagaceae</i>						
15	Вор6-147	LT796246	3	MF040568.1 Uncultured bacterium clone DWJ05E 99.78		1.0–2.0 × <4.0
16	Вор6-56	LT796247	1	KX990239 <i>Flavitalea</i> sp. Ap19E, 93.1 GU305721 Uncultured bacterium clone МУУ31, 99.7		0.2–0.4 × 1.7–2.0
17	Вор6-62	LT796248	1	KY060007 <i>Terrimonas</i> sp. C3-5, 96.5 FN668080 Uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp. clone ZS-2-342, 99.8		0.3–0.5 × 1.8–3.0
18	Вор6-104 Вор6-152	LT796249 LT796250	3	KC505149 <i>Sediminibacterium</i> sp. JJ2209, 96.5 FN668082 Uncultured <i>Sphingobacterium</i> sp., clone ZS-2-52, 99.8		0.2–0.8 × 1.0–3.0
<i>Gemmatimonadetes</i>						
19	Вор6-57	LT796251	2	KF481682 <i>Gemmatimonas phototrophica</i> AP64, 91.3 EU803292 Uncultured bacterium clone 5C230840, 99.7	<i>Gemmatimonadales,</i> <i>Gemmatimonadaceae</i>	0.7–2.5 × 3.2
<i>Verrucomicrobia</i>						
20	Вор6-34	LT796252	4	NR_133878 <i>Terrimicrobium sacchariphilum</i> NM-5, 93.56 KP686964 Uncultured bacterium clone T6_0211_66, 99.78		0.5–0.7 × 0.6–1.2
21	Вор6-22	LT796253	1	GU305779 Uncultured bacterium clone МУУ38, 100	<i>Opitutae,</i> <i>Punicetococcales,</i> <i>Punicetococcaceae</i>	0.8–1.0
22	Вор6-10	LT796254	1	HM856557 Uncultured <i>Opitutae</i> bacterium clone YL196, 100		
23	Вор6-101	LT796255	1	HF947551 <i>Limisphaera ngatamarikiensis</i> NGM72.4, 91.4 HM856557 Uncultured <i>Opitutae</i> bacterium clone YL196, 100	<i>Verrucomicrobiae,</i> <i>Verrucomicrobiales</i>	0.5–0.8
<i>Acidobacteria</i>						
24	Вор6-64	LT796256	1	HF559177 <i>Geothrix fermentans</i> HradG1, 93.8 EU803771 Uncultured bacterium clone 5C231394, 99.7	<i>Holophagae,</i> <i>Holophagales,</i> <i>Holophagaceae</i>	0.1–2.0 × 3.0
<i>Eukaryota</i>						
25	Вор6-12 Вор6-59	LT796257 LT796258	7	MG520331 <i>Chrysochromulina parva</i> , 99.89–100.0 AB930789 Uncultured bacterium clone Fei_13Dec10m_67, 99.7–99.8	<i>Haptista;</i> <i>Haptophyta;</i> <i>Prymnesiophyceae;</i> <i>Prymnesiales;</i> <i>Chrysochromulinaceae</i>	3.0–50.0
26	Вор6-150	LT796259	1	LC484192 <i>Cryptomonas curvata</i> CСAP979/52, 99.1 MW128024 Uncultured bacterium clone SupB2020, 99.6	<i>Cryptophyta;</i> <i>Cryptomonadales;</i> <i>Cryptomonadaceae</i>	4.0–9.0

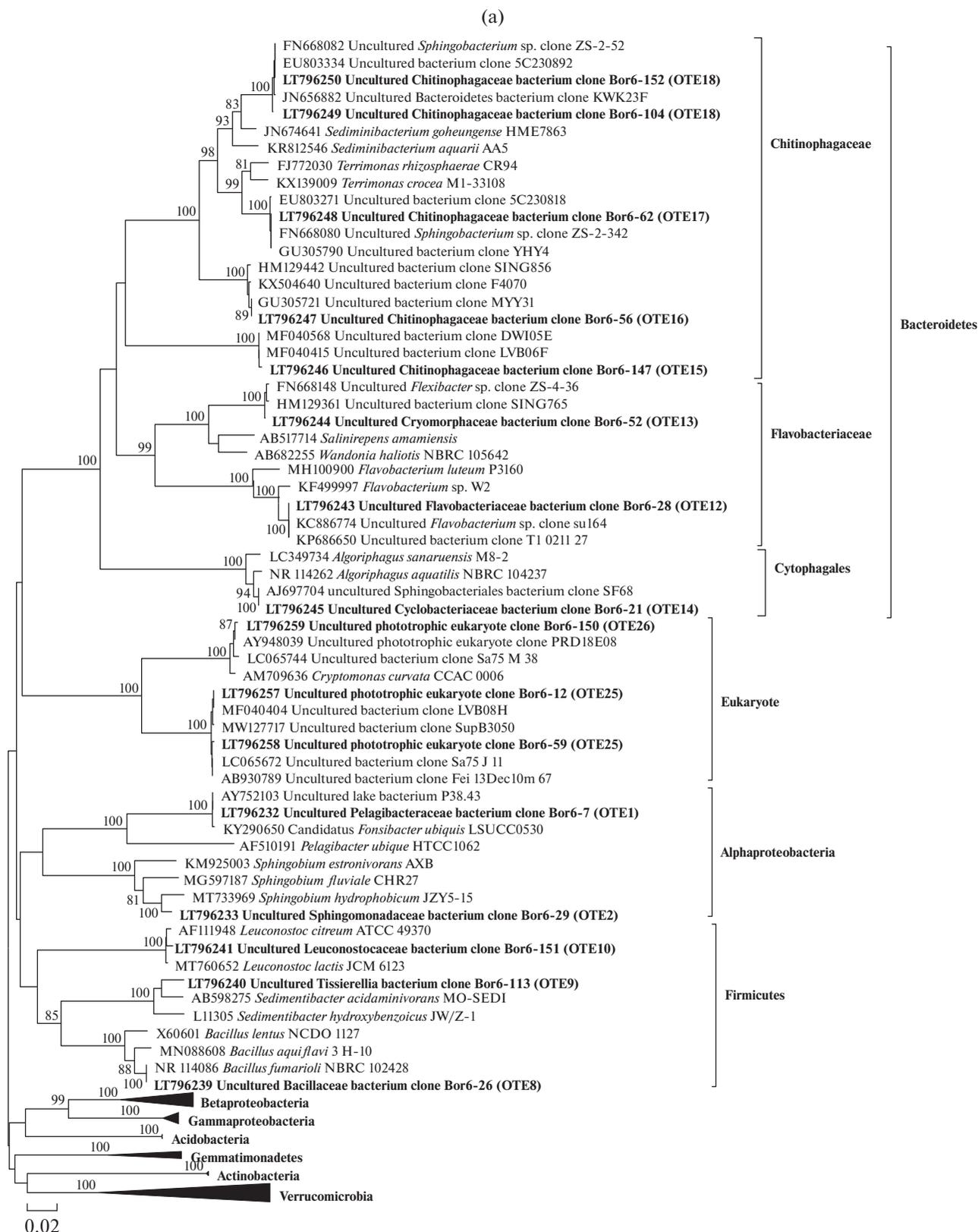


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное методом объединения ближайших соседей (Kimura 2-parameter model) по фрагменту гена 16S рРНК (850 п.н.). (а) – Представители филумов эубактерий *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, *Firmicutes*, а также *Eukaryota*; (б) – представители филумов *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Actinobacteria*. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. В круглых скобках указаны номера ОТЕ. Бутстреп-поддержка рассчитана с учетом 1000 реплик, значения меньше 80 не представлены. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар нуклеотидов.

(б)

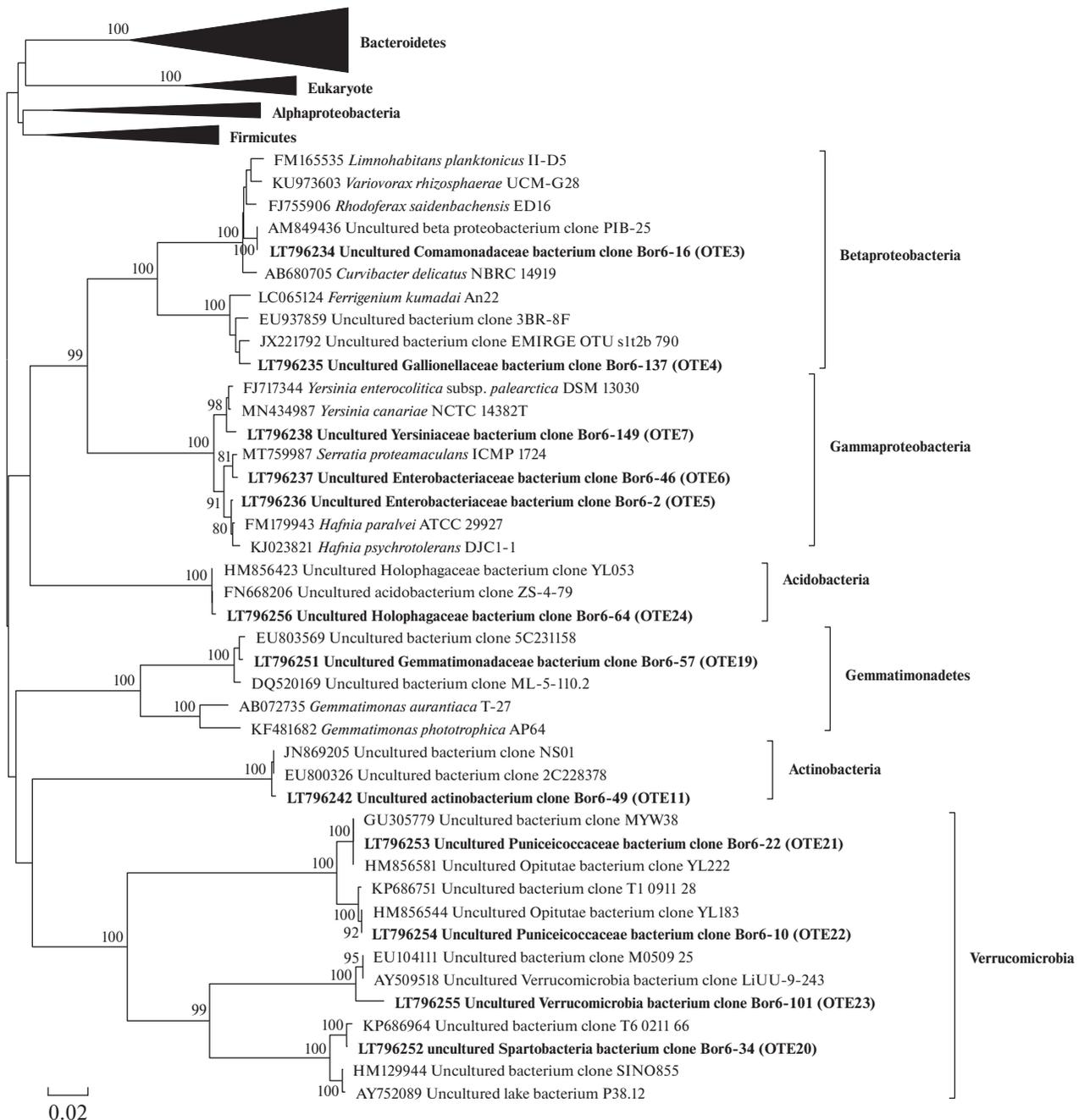


Рис. 1. Окончание

ОБСУЖДЕНИЕ

Размерно-морфологическая структура бактериопланктона. Основу бактериопланктона Рыбинского водохранилища, как и большинства других водоемов, составляют одиночные бактерии, занимающие более половины его биомассы. Доля бактерий, прикрепленных к детриту, увеличивается в летний период. В среднем за вегетационный сезон основной вклад в продукцию бакте-

риопланктона и его потребление консументами вносят крупные палочки (Копылов, Косолапов, 2008). Остальные группы бактерий имеют менее высокие скорости роста, проигрывают крупным палочкам конкурентную борьбу за субстраты, но при этом остаются разнообразными. В связи с благоприятными фотическими условиями, сравнительно высоким содержанием биогенных элементов и органических субстратов на ст. Молога

процессы первичной продукции планктона, продукции гетеротрофных бактерий и деструкции органических веществ протекают в 1.5–2 раза интенсивнее, чем на других участках водохранилища (Романенко, 1985; Копылов, Косолапов, 2008).

Отбор проб проводили в сезон, когда крупные палочки элиминируются естественным путем и в сообществе их становится значительно меньше, чем во время пиков количественного развития бактериопланктона, когда они могут составлять до 5% биомассы (Копылов, Косолапов, 2008). В начале июля в период уменьшения численности бактерий их продукция в Волжском плесе снижается до среднего уровня по водохранилищу (Копылов и соавт., 2007).

В период отбора проб на ст. Молога численность и биомасса ГНФ были сравнительно высокими, а численность вириопланктона низкой, по сравнению с другими участками. В бактериопланктоне, биомасса которого была также высокой, отсутствовали крупные палочки, а преобладали средне- и мелкоразмерные клетки. К развитию последних, по-видимому, приводит избирательное действие протистов и вирусов.

Ранее было показано, что в размерно-морфологической структуре бактериопланктона пресноводного озера в Австрии мелкие клетки (диаметром <0.4 мкм) составляют 15–33% его численности, но при этом занимают не более 6% общей биомассы (Pernthaler et al., 1996). Наиболее представлены в бактериопланктоне кокки диаметром ≥ 0.4 мкм и мелкие палочки (1.2×0.4 мкм), которые занимают до 70% общей биомассы сообщества, а крупные палочки ($>2.4 \times 0.4$ мкм) составляют 20–50% биомассы. Вероятно, в среднем за сезон приоритет в метаболизме сообщества у мелких кокков и крупных палочек, которые выигрывают конкурентную борьбу за субстраты, но наиболее уязвимы для консументов и вирусов. Клетки средних размеров проявляют активность в периоды элиминирования мелких клеток и крупных палочек, также они постоянно преобладают по численности и биомассе. В начале июля в Рыбинском водохранилище доминирующими морфотипами были мелкие палочки и кокки. Эти же группы в водохранилище Сербии составляли до 68% и до 40% численности бактериопланктона соответственно (Ciric et al., 2012).

Итак, сообщество планктонных бактерий на ст. Молога Рыбинского водохранилища активно функционирует даже в период понижения его количественных показателей на фоне развития ГНФ. Главная роль в выполнении основных функций сообщества переходит к мелким палочкам, рост и размножение которых ускоряется, а разнообразие остается на высоком уровне.

Таксономическое разнообразие бактериопланктона. Среди доминирующих филумов в бактерио-

планктоне Рыбинского водохранилища отмечены *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*, а также *Verrucomicrobia*, что согласуется с опубликованными данными мировой литературы (Polverino et al., 2012; Iliev et al., 2017; Qu et al., 2018; Кузнецова и соавт., 2020).

Представители *Proteobacteria* включали три класса *Alpha*-, *Beta*- и *Gammaproteobacteria*. Разнообразие класса альфапротеобактерий на данной станции было низким, но по количественному показателю отмечено преобладание одного вида, который является многочисленным и широко распространенным в пресноводных экосистемах со сложными сезонными моделями аллохтонных и автохтонных источников углерода. Максимальная представленность (13 последовательностей) получена для ОТЕ 1, которая охарактеризована как *Candidatus Fonsibacter ubiquis* – это маленькие изогнутые палочки размером 1×0.2 мкм. Типовым материалом для этого вида является геном WB8_6_001, идентифицированный в пресноводных озерах вдоль реки Чаттахучи, США (Tsementzi et al., 2019). Бактерии отряда “*Ca. Pelagibacterales*”, обычно обозначаемые как SAR11, составляют самую многочисленную группу микробов в океанах. Бактерии SAR11 клады IIIb распространены глобально и исключительно в пресноводных средах, где они являются одними из наиболее доминирующих представителей, составляя до 20% сообществ озерных бактерий (Tsementzi et al., 2019).

Интересно отметить присутствие гаммапротеобактерий таких родов как *Hafnia*, *Serratia* и *Yersinia*, представители которых относятся к условно-патогенным микроорганизмам, что указывает на поступление антропогенного загрязнения исследуемого участка водохранилища. В летний период при высокой температуре поверхности воды (20°C) данные бактерии способны сохраняться длительное время. Кроме того, их присутствие в воде может указывать на высокую трофность водохранилища.

Следующей группой по представленности последовательностей стал филум *Bacteroidetes*. Филогенетический анализ показал высокое разнообразие полученных последовательностей, без доминирующего вида в этой группе. Большая часть последовательностей принадлежала семейству *Chitinophagaceae* и порядку *Flavobacteriales*. Представителей этой филы бактерий часто детектируют при интенсивном цветении водоемов (Fernandez-Gomez et al., 2013), кроме того ближайшие родственники были выделены из пресных озер и рек. В бактериопланктоне мезотрофного озера во Франции преобладали филумы *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* (Debroas et al., 2009). Экологическая роль бактерий филума *Bacteroidetes* состояла в потреблении и переработке гликана и углеводов.

Можно предположить, что выявленное в пелагиали Рыбинского водохранилища высокое разнообразие филума *Bacteroidetes* свидетельствует о том, что на этом участке активно метаболизируются легкоокисляемые органические вещества. Богатство представителей филума *Bacteroidetes* положительно коррелирует с продуктивностью вод, что обычно наблюдается у животных и растений, но в меньшей мере выявляется или отсутствует у других филумов эубактерий (Lindstrom, 2001).

Представители филума *Verrucomicrobia* образовали кластеры с некультивируемыми бактериями. Филум *Verrucomicrobia* содержит пресноводных представителей, которые остаются малоизученными на геномном, таксономическом и экологическом уровнях (Cabello-Yeves et al., 2017). Недавно были реконструированы геномы веррукомикробий из двух пресноводных водоемов, расположенных близко друг к другу (Тус и Амадорио, Испания). Эти геномы, собранные метагеномами (MAG), показывают таксономическое разнообразие внутри филума и включают широкий диапазон предполагаемых размеров генома (от 1.8 до 6 Мб). Среди всех изученных *Verrucomicrobia* был обнаружен один из самых маленьких геномов классов *Spartobacteria* и *Opiritae* (Cabello-Yeves et al., 2017). Некоторые из семейства *Opiritae* были небольшими, космополитичными, с общим гетеротрофным метаболизмом с предпочтением углеводов и способными к деградации ксилана, хитина или целлюлозы. Кроме того, получены большие копиотрофные геномы, которые содержат участки, ответственные за разложение полисахаридов и в целом имеют больше стратегий для поглощения питательных веществ и углеводного обмена (Cabello-Yeves et al., 2017). Выявлены геномы с интересными особенностями, например, обнаружены родопсины, поглощающие зеленый свет, и полный набор генов, участвующих в азотфиксации. Эти результаты подчеркивают разнообразие этой клады в пресноводных водах и еще больше расширяют и без того широкий эко-физиологический диапазон этих микробов (Cabello-Yeves et al., 2017).

Бактерии родов *Bacillus*, *Leuconostoc* и *Sedimentibacter* (*Firmicutes*) — крупные палочки с гетеротрофным типом питания, участвуют в разложении органических веществ, способны образовывать споры в неблагоприятный период развития. Вероятно, в бактериопланктоне присутствовали именно споровые формы, поскольку в размерно-морфологической структуре отсутствовали крупные палочки.

Хлоропластная ДНК определена для хризофитовых и гаптофитовых водорослей, которые характеризуются как фототрофные эукариоты, принадлежащие одноклеточным водорослям. Известно, что особи *Chrysochromulina* вырастают от 3.0 до 13.0 мкм

в длину. *Chrysochromulina*, как один из родов гаптофитовых водорослей, играет важную роль в глобальном связывании углерода и формировании токсичного цветения в Мировом океане (Cuvellier et al., 2010). Большинство гаптофитов являются фотосинтезирующими микроводорослями, а некоторые из них миксотрофны. Гаптофиты могут жить как в пресных, так и в морских водоемах. Такой комбинированный образ жизни делает гаптофиты эффективными организмами в глобальной фиксации углерода, и они занимают от 30 до 50% фотосинтетической биомассы в океане.

Минорными отмечены представители филумов *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Нуклеотидные последовательности, принадлежащие филумам *Gemmatimonadetes* и *Acidobacteria*, имеют не идентифицированных гомологов. Нуклеотидная последовательность клона Bor6-49 имеет ближайшего гомолога Candidatus *Nanopelagicus limnes* MMS-21-122 с гомологией 99.55% (*Actinobacteria*). Этот вид является одним из самых мелких бактерий, объем клетки 0.018 мкм³, размер генома 1.24 Мб, выделен из олигомезотрофного Цюрихского озера (Швейцария), которое характеризуется стойким ежегодным цветением токсичных цианобактерий *Planktothrix rubescens* (Neuenschwander et al., 2018). Уменьшение генома этих бактерий могло привести к ауксотрофии по различным витаминам, аминокислотам, тем самым создавая зависимость от сопутствующих организмов (гипотеза “Черной королевы”). Более того, анализ генома выявил удивительную степень меж- и внутривидового разнообразия метаболических путей, особенно транспорта и метаболизма углеводов. Поразительная микродиверсификация генотипов актинобактерий acI может объяснить их глобальный успех в высокодинамичных пресноводных средах со сложными сезонными моделями аллохтонных и автохтонных источников углерода (Neuenschwander et al., 2018).

Интересно отметить, что полученные данные в дальнейшем можно использовать для *in situ* гибридизации, чтобы оценить вклад каждой из таксономической групп в этот период развития бактериального сообщества. В результате проведенной префильтрации проб, мы отсекали агрегированные и крупные бактерии, тем самым изучили разнообразие одиночных средних и мелких микроорганизмов. Кроме того, интересно изучить таксономический состав бактериопланктона в период максимальных пиков развития с преобладанием крупных клеток. Эти исследования покажут полную картину разнообразия и структуры бактериопланктона Рыбинского водохранилища.

Таким образом, на станции Молога генетическое разнообразие бактериопланктона в летний период (июль) представлено филумами *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*,

Gemmatimonadetes, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Доминирующими отмечены альфапротеобактерии, бактериоиды и веррукомикробии, ближайшие гомологи которых, являются некультивируемыми и широко распространенными в пресных водоемах. Данные виды бактерий имеют маленькие размеры клеток и геномы, при этом активно участвуют в разложении органических веществ.

Впервые с помощью молекулярно-генетических методов изучено таксономическое разнообразие и соотнесено с размерно-морфологической структурой бактериопланктона Рыбинского водохранилища в летний период. Установлено высокое таксономическое разнообразие (26 ОТЕ) с преобладанием некультивируемых и неидентифицируемых бактерий. Результаты согласуются с мировыми публикациями и показывают, что Рыбинское водохранилище – это резервуар для развития широко распространенных бактерий из филумов *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* и *Actinobacteria*. Кроме того, морфологическая структура бактериального сообщества подтверждает молекулярно-генетические исследования о присутствии и доминировании средне- и мелкоразмерных клеток, к которым относятся ближайшие гомологи полученных нуклеотидных последовательностей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доценту, к. б. н. Н.Л. Бельковой за помощь в получении результатов молекулярно-генетического анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ АААА-А18-118012690098-5) при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-34-50453 мол-нр).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Денисова Л.Я., Белькова Н.Л., Тулохонов И.И., Зайчиков Е.Ф. Биоразнообразие бактерий на различных глубинах южной котловины озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // *Микробиология*. 1999. Т. 68. С. 475–483.
 Denisova L.Ya., Bel'kova N.L., Tulokhonov I.I., Zaichikov E.F. Bacterial diversity at various depths in the southern part of

Lake Baikal as revealed by 16S rRNA sequencing // *Microbiology (Moscow)*. 1999. V. 68. P. 547–556.

Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Вирусы в планктоне Рыбинского водохранилища // *Микробиология*. 2007. Т. 76. С. 879–887.

Kopylov A.I., Kosolapov D.B., Zobotkina E.A. Viruses in the plankton of the Rybinsk Reservoir // *Microbiology (Moscow)*. 2007. V. 76. P. 782–790.

Копылов А.И., Косолапов Д.Б. Бактериопланктон водохранилищ Верхней и Средней Волги. М.: Изд-во совр. гум. универ., 2008. 377 с.

Кузнецова Е.В., Косолапов Д.Б., Белькова Н.Л. Разнообразие планктонных бактерий Дургунского и Тайширского водохранилищ (Западная Монголия) // *Микробиология*. 2020а. Т. 89. С. 604–611.

Kuznetsova E.V., Kosolapov D.B., Belkova N.L. Diversity of planktonic bacteria in Durgun and Taishir reservoirs (Western Mongolia) // *Microbiology (Moscow)*. 2020. V. 89. P. 595–602.

Кузнецова Е.В., Косолапов Д.Б., Косолапова Н.Г. Таксономическая и размерно-морфологическая структура двух водохранилищ Монголии // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2020б. № 1. С. 22–29.

Kuznetsova E.V., Kosolapov D.B., Kosolapova N.G. Taxonomic and size-morphological groups of bacterioplankton in two mongolian reservoirs // *Biology Bull.* 2020. V. 47. P. 27–34.

Минеева Н.М., Макарова О.С. Содержание хлорофилла как показатель современного (2015–2016 гг.) трофического состояния водохранилищ Волги // *Биол. внутр. вод*. 2018. № 3. С. 107–110.

Mineeva N.M., Makarova O.S. Chlorophyll content as indicator of the modern (2015–2016) trophic state of Volga River reservoirs // *Inland Water Biol.* 2018. V. 11. P. 367–370.

Раднагуруева А.А., Зайцева С.В., Лаврентьева Е.В. Таксономическое разнообразие микробного сообщества термальных источников Байкальской рифтовой зоны // *Биотехнология в интересах экономики и экологии Сибири и Дальнего Востока*. 2016. С. 98–100.

Романенко В.И. Микробиологические процессы продукции и деструкции органического вещества во внутренних водоемах. Л.: Наука, 1985. 295 с.

Романенко В.И., Захарова Л.И., Романенко В.А. Оценка качества воды по микробиологическим показателям в Рыбинском водохранилище у г. Череповца // *Влияние стоков Череповецкого промышленного узла на экологическое состояние Рыбинского водохранилища* / Отв. ред. Флеров Б.А. Рыбинск: 1990. С. 24–41.

Рыбакова И.В., Белькова Н.Л., Лаптева Н.А., Суханова Е.В. Адаптация молекулярно-генетических методов для изучения таксономического разнообразия, ассоциированных с макрофитами // *Биол. внутр. вод*. 2009. № 1. С. 102–110.

Rybakova I.V., Lapteva N.A., Sukhanova E.V., Bel'kova N.L. Adapting molecular-genetic methods for studying the taxonomic diversity of microbial communities associated with macrophytes // *Inland Water Biol.* 2009. V. 2. P. 96–103.

- Cabello-Yeves P.J., Ghai R., Mehrshad M., Picazo A., Camacho A., Rodriguez-Valera F.* Reconstruction of diverse verrucomicrobial genomes from metagenome datasets of freshwater reservoirs // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 2131. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02131>
- Caron D.A.* Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures // *Appl. Environ. Microbiol.* 1983. V. 46. P. 491–498.
- Ciric S., Ilic Z., Milosevic B., Knezevic J., Spasic Z.* Abundance and morphotype diversity of bacterioplankton in Celijski Reservoir, Serbia // *Fresen. Environ. Bull.* 2012. V. 21. № 6b. P. 1647–1653.
- Cuvelier M., Allen A., Monier A., McCrow J., Messié M., Tringe S., Woyke T., Welsh R., Isohoy T., Lee J.-H., Binder B.J., Dupont C.L., Latasa M., Guigand C., Buck K.R., Hilton J., Thiagarajan M., Caler E., Read B., Lasken R.S., Chavez F.P., Worden A.Z.* Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 14679–14684.
- Debroas D., Humbert J.-F., Enault F., Bronner G., Faubladier M., Cornillot E.* Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (lac du Bourget – France) // *Environ. Microbiol.* 2009. V. 11. P. 2412–2424.
- Fernandez-Gomez B., Richter M., Schüller M., Pinhassi J., Acinas S.G., González J.M., Pedrós-Alió C.* Ecology of marine *Bacteroidetes*: a comparative genomics approach // *ISME J.* 2013. V. 7. P. 1026–1037.
- Iliev I., Yahubyan G., Marhova M., Apostolova E., Gozmanova M., Gecheva G., Kostadinova S., Ivanova A., Baev V.* Metagenomic profiling of the microbial freshwater communities in two Bulgarian reservoirs // *J. Basic Microbiol.* 2017. V. 57. P. 669–679.
- Karayanni H., Macingo S.C., Tolis V., Alivertis D.* Diversity of bacteria in lakes with different chlorophyll content and investigation of their respiratory activity through a long-term microcosm experiment // *Water.* 2019. V. 11. P. 467–482. <https://doi.org/10.3390/w11030467>
- Krambeck C., Krambeck H.-J., Overbeck J.* Microcomputer assisted biomass determination of plankton bacteria on scanning electron micrographs // *Appl. Environ. Microbiol.* 1981. V. 42. P. 142–149.
- Lindström E.S.* Investigating influential factors on bacterioplankton community composition: results from a field study of five mesotrophic lakes // *Microbial Ecol.* 2001. V. 42. P. 598–605.
- Neuenschwander S.M., Ghai R., Pernthaler J., Salcher M.M.* Microdiversification in genome-streamlined ubiquitous freshwater *Actinobacteria* // *ISME J.* 2018. V. 12. P. 185–198.
- Noble R.T., Fuhrman J.A.* Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria // *Aquat. Microb. Ecol.* 1998. V. 14. P. 113–118.
- Pernthaler J., Sattler B., Simek K., Schwarzenbacher A., Psenner R.* Top-down effects on the size-biomass distribution of a freshwater bacterioplankton community // *Aquat. Microb. Ecol.* 1996. V. 10. P. 255–263.
- Polverino D., Marinelarena A.J., McCarthy C.B., Rivera-Pomar R.V.* Culture-independent characterization of the bacterioplankton community composition of a mesotrophic reservoir (Embalse Rio III, Argentina) // *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 2012. V. 83. P. 548–552.
- Porter K.G., Feig Y.S.* The use of DAPI for identifying and counting of aquatic microflora // *Limnol. Oceanogr.* 1980. V. 25. P. 943–948.
- Qu J., Jia C., Liu Q., Li Z., Liu P., Yang M., Zhao M., Li W., Zhu H., Zhang Q.* Dynamics of bacterial community diversity and structure in the terminal reservoir of the South-to North water diversion project in China // *Water.* 2018. V. 10. P. 709–722.
- Ruiz-Gonzalez C., Proia L., Ferrera I., Gasol J.M., Sabater S.* Effects of large river dam regulation of bacterioplankton community structure // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2013. V. 84. P. 316–331.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schiaffino M.R., Sanchez M.L., Gereá M., Unrein F., Balague V., Gasol J.M., Izaguirre I.* Distribution patterns of the abundance of major bacterial and archaeal groups in Patagonian lakes // *J. Plankton Res.* 2016. V. 38. P. 64–82.
- Simek K., Hornak K., Jezbera J., Nedoma J., Znachor P., Hejzlar J., Seda J.* Spatio-temporal patterns of bacterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacterivory in a dam reservoir // *Aquat. Microb. Ecol.* 2008. V. 51. P. 249–262.
- The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria /* Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. New York: Springer-Verlag, 2006.
- Tsementzi D., Rodriguez-R.L.M., Ruiz-Perez C.A., Meziti A., Hatt J.K., Konstantinidis K.T.* Ecogenomic characterization of widespread, closely-related SAR11 clades of the freshwater genus “*Candidatus Fonsibacter*” and proposal of *Candidatus Fonsibacter lacus* sp. nov. // *Syst. Appl. Microbiol.* 2019. V. 42. P. 495–505.
- Tsydenova B.V., Dagurova O.P., Garankina V.P., Dambaev V.B., Matafonov D.V., Baturina O.A.* Abundance and taxonomic composition of bacterioplankton in freshwater Lake Gusinoe (Buryatia) in the warm water zone of the Gusinozerskaya thermal power plant // *J. Siberian Fed. Univ. Biology.* 2018. V. 11. P. 356–366.
- Wei G., Li J., Wang N., Gao Z.* Spatial abundance and diversity of bacterioplankton in a typical stream-forming ecosystem, Huangqian Reservoir, China // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. V. 24. P. 1308–1318.
- Yang X., Huang T., Zhang H.* Effects of seasonal thermal stratification on the functional diversity and composition of the microbial community in a drinking water reservoir // *Water.* 2015. V. 7. P. 5525–5546.

Taxonomic Diversity and Size-Morphological Structure of Bacterioplankton of the Rybinsk Reservoir

E. V. Kuznetsova^{1, *}, E. V. Sukhanova², and D. B. Kosolapov^{1, 3}

¹*Papanin Institute of Inland Water Biology, Russian Academy of Sciences, Borok, 152742 Russia*

²*Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia*

³*Cherepovets State University, Cherepovets, 162600 Russia*

*e-mail: elivic.rum@gmail.com

Received December 30, 2020; revised January 20, 2021; accepted January 27, 2021

Abstract—This is the first report on investigation of bacterioplankton taxonomic composition in the Rybinsk Reservoir by molecular biological methods. A total of 58 nucleotide sequences obtained were assigned to 26 operational taxonomic units (OTUs), which belonged to *Eubacteria* (24 OTUs) and *Eukaryota* (2 OTUs). The diversity of bacterioplankton was represented by seven phyla of eubacteria: *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, and *Acidobacteria*. Predominant organisms were alphaproteobacteria of the species “*Candidatus Fonsibacter ubiqvis*,” as well as unidentified members of the phyla *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia*, whose homologues are widespread in freshwater environments and have small genomes and cells. During the study period, small and medium-sized free-living cells predominated in bacterioplankton (70–99%), because they were the least vulnerable to eliminating control factors. The majority of the bacterial community was formed by cocci (50–80%), while a significant part of its biomass was accounted for by small rods (up to 2 μm in length) (20–30%).

Keywords: bacterial community, phylogenetic analysis, 16S rRNA, Sanger sequencing, taxonomic composition, size-morphological structure