

Сезонные особенности потребления лизина некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища

М. Ю. ТРУСОВА¹, О. В. КОЛМАКОВА^{1,2}, М. И. ГЛАДЫШЕВ^{1,2}

¹ Институт биофизики СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50, стр. 50
E-mail: mtrusova@ibp.krasn.ru

² Сибирский федеральный университет
660041, Красноярск, просп. Свободный, 79

АННОТАЦИЯ

С применением метода ПЦР-ДГГЭ изучена динамика бактериопланктонного сообщества эвтрофного водохранилища в лабораторных микроэкосистемах с добавлением аминокислоты лизин. Полученные данные подтверждают гипотезу об узкой специализации видов бактериопланктона к потреблению отдельных органических веществ.

Ключевые слова: денатурирующий градиентный гель-электрофорез, микроэкосистема (МЭС), некультивируемый бактериопланктон, лизин, биогеохимическая функция, эвтрофное водохранилище, 16S рибосомальная РНК.

В последние десятилетия с развитием и широким внедрением молекулярно-генетических методов водная микробиология достигла значительных успехов. Состав бактериопланктонного сообщества может быть легко определен благодаря независимому от культуральных методов анализу 16S рибосомальной РНК. В то время как происходит стремительное накопление данных о последовательностях бактериальных геномов, одной из самых актуальных задач становится определение не только видового состава бактериопланктона, но и биогеохимической функции, выполняемой каждым конкретным видом, т. е. того, какие вещества он потребляет, как взаимодействует с другими организмами и как вписывается в функционирование пелагического сообщества [1–3]. Хотя определенные

виды бактериопланктона могут демонстрировать предрасположенность к конкретным органическим субстратам, до настоящего времени предпринимались лишь немногочисленные попытки определить метаболические роли индивидуальных таксонов бактериопланктона [3, 4].

Благодаря современным молекулярным методам стало возможным определить связь между таксоном и биогеохимической функцией бактериопланктона. Тем не менее во многих случаях использование этих методов приводит к неоднозначным выводам. Например, для выяснения метаболической роли морских планктонных архей использовалась комбинация меченого субстрата и флуоресцентной гибридизации *in situ* (STARFISH) [5]. После добавления смеси ³H-меченных L-аминокислот в пробы воды около 60 % архей выявлялось автордиографией, и на этом

основании они были отнесены к гетеротрофам. Однако последующие исследования показали, что археи являются в основном хемоавтотрофами [2]. Другой молекулярный метод, позволяющий выявить специфические метаболические функции видов бактериопланктона, – это метагеномный анализ. При этом во многих случаях наблюдаемый состав метагенома противоречит основной метаболической специализации бактериопланктонного сообщества [3]. Например, присутствие генов протеородопсина в морских планктонных бактериях должно свидетельствовать о том, что клетки способны использовать протеородопсин для получения энергии, т. е. они должны быстрее расти на свету, чем в темноте. Однако разные таксоны, содержащие ген протеородопсина, имели различные отклики на свет и его отсутствие, и большинство из них не увеличивало скорость роста на свету [2]. Многие авторы предполагают, что с помощью молекулярных методов можно собрать важную информацию о биогеохимической активности микроорганизмов в том случае, если они используются в сочетании с методом экспериментальных микроэкосистем (мезокосмов), содержащих нативные пробы природных популяций бактериопланктона, в которые добавляются тестируемые питательные вещества [1, 6–8]. Для мониторинга изменений состава доминирующих видов внутри бактериальных сообществ в экспериментальных микроэкосистемах (МЭС) часто используется метод разделения амплифицированных фрагментов гена 16S рибосомальной РНК с помощью денатурирующего градиентного гель-электрофореза [6, 9].

В экспериментах с МЭС многие исследователи в качестве добавок для гетеротрофного бактериопланктона используют аминокислоты, поскольку эти вещества в больших количествах выделяются из растущего и отмирающего фито- и зоопланктона и являются одним из наиболее предпочитаемых бактериями органических компонентов [10]. Однако до сих пор не ясно, специализируются ли определенные виды бактериопланктона на потреблении конкретных аминокислот [8].

Ранее нами установлено, что виды (генотипы) свободноживущего бактериопланктона

Lys1 и *Lys2* являются узкоспециализированными по потреблению аминокислоты лизина в летнем эксперименте 2004 г. [11]. Цель данной работы – изучение отклика бактериального сообщества пресноводного водоема Бугач на добавку лизина в разные периоды вегетационного сезона. Лизин является характерной кислотой в общем пуле аминокислот водохранилища, его концентрация составляет около $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ [12]. Кроме того, лизин – незаменимая аминокислота для животных, занимающих высший уровень трофической цепи водных экосистем, – рыб [13, 14].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Описание эксперимента. Природную воду для экспериментов отбирали в водохранилище Бугач ($56^{\circ}03'1''$ с. ш., $92^{\circ}43'33''$ в. д.). Водоохранилище Бугач – малый эвтрофный водоем рекреационного и рыбоводного назначения, образованный на вторичном притоке Енисея в пригороде г. Красноярска. Площадь поверхности около 21 га, максимальная глубина – 5 м, средняя – 3 м. Прозрачность по диску Секки – 0,25–0,8 м, значения pH – 7,9–9,5. В начале вегетационного сезона в мае – июне в водохранилище происходит массовое развитие диатомовых и водорослей, тогда как в июле – августе наблюдается “цветение” воды цианобактериями или доминирование динофитовых водорослей. Подробное описание экосистемы водохранилища, включая состав растворенных в воде аминокислот, приведено в работах [12, 15–18].

Проведено 4 эксперимента в разные периоды вегетационного сезона (I – с 30 июня по 6 июля 2004 г.; II – с 17 по 23 августа 2005 г.; III – с 17 по 23 мая 2006 г.; IV – с 31 июля по 5 августа 2009 г.). Эксперименты проводили в лабораторных микроэкосистемах объемом 10 л. Подробное описание МЭС дано в работах [19, 20]. Ранее установлено, что в МЭС в течение 7–10 сут сохраняется и функционирует естественное планктонное сообщество [21]. Пробы воды из водохранилища, содержащие естественный планктон, инокулировали в МЭС без предварительной фильтрации и добавляли аминокис-

лоту L-лизин (лизина монохлоридат, Реахим) в концентрации $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Хотя в водохранилище Бугач наблюдаемые концентрации лизина составляли около $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ [12], для обеспечения отклика бактериального сообщества на добавляемый субстрат использованы 100-кратные концентрации аминокислоты.

В МЭС поддерживалась температура воды, соответствующая измеренной в водохранилище в момент отбора проб для инокуляции. Освещенность МЭС была $7,0 \text{ Вт/м}^2$, фотопериод в I, III, IV экспериментах – 16 ч свет, 8 ч темнота, во II эксперименте, проводившемся во второй половине августа, – 14 ч свет, 10 ч темнота. Перемешивание воды в МЭС проводилось 1–2 раза в сутки стеклянным шпателем. При заполнении МЭС брали исходную пробу воды, далее после внесения добавки ежедневно в течение 5–6 сут отбирали по 100 мл воды из каждой МЭС для анализа состава бактериопланктона методом ДГГЭ.

Выделение геномной ДНК. После предварительной фильтрации через крупнопористые мембранные фильтры $1,5\text{--}3 \text{ мкм}$ бактериопланктон концентрировали из объема 100 мл фильтрованием на стерильных фильтрах с диаметром пор $0,22 \text{ мкм}$. Предварительная фильтрация в майском эксперименте III не проводилась, так как не было массового цветения фитопланктона. Геномную ДНК из бактериопланктона, сконцентрированного на фильтрах, выделяли по методу Бострома с соавторами [22]. Для этого фильтры разрезали на части, помещали в стерильные пластиковые пробирки и добавляли лизирующий буфер (400 mM NaCl , 750 mM сахараза, 20 mM ЭДТА, 50 mM Tris-HCl pH 9,0) и раствор лизоцима (конечная концентрация $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$), инкубировали 30 мин при $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Затем в пробирки добавляли раствор додецилсульфата натрия (SDS, конечная концентрация 1 %) и раствор протеиназы К (конечная концентрация $100 \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$) и инкубировали с постоянным перемешиванием при $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 12 ч. Продукты лизиса переносили в чистые пробирки, фильтры дополнительно промывали 500 мкл ТЕ буфера (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 2 mM ЭДТА), который затем объединяли с лизатами. ДНК из ДНК-

содержащих растворов осаждали этанольной преципитацией в присутствии соосадителя. Полученные осадки ДНК растворяли в 100 мкл буфера ТЕ.

Качество и количество выделенной высокомолекулярной ДНК анализировали горизонтальным электрофорезом в 1 % агарозном геле.

Аmplификация гена 16S рРНК и денатурирующий градиентный гель-электрофорез. Фрагменты гена 16S рРНК длиной 586 п. н. амплифицировали из суммарной геномной ДНК бактериопланктона с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами GC-341F (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3', на 5'-конце присоединен "GC-clamp" 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C-3') и 926R (5'-CCG TCA ATT CA/CT TTG AGT TT-3') [23]. Реакционная смесь для ПЦР оптимизирована под данную пару праймеров и содержала: 67 mM Tris-HCl, pH 8,8 при $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,01 \text{ \%}$ Tween 20, $16,6 \text{ mM}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $1,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , 2 \% диметилсульфоксида, BSA, $0,2 \text{ mM}$ каждого dNTP, по 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. акт. Taq ДНК полимеразы, 10 нг ДНК. ПЦР проводили на приборе DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США) в следующем температурно-временном режиме: начальная денатурация – $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 90 с; первый цикл – $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 с; $63 \text{ }^\circ\text{C}$, 40 с; $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 50 с; затем понижение температуры отжига на $1 \text{ }^\circ\text{C/цикл}$ в течение 10 циклов; затем 20 циклов – $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 с; $53 \text{ }^\circ\text{C}$, 40 с; $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 50 с и окончательная полимеризация при $72 \text{ }^\circ\text{C}$, 7 мин. Для контроля контаминации ставили отрицательную контрольную реакцию, в которую вместо ДНК-матрицы добавляли стерильную воду. Количество и размер продуктов ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 1,2 % агарозном геле. ПЦР-продукты концентрировали этанольным переосаждением и использовали около 800 нг полученной ДНК для анализа методом ДГГЭ.

ДГГЭ выполняли на приборе DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, США) в 6 % полиакриламидном геле с градиентом денатурирующего фактора от 25 до 65 % (100 % денатурирующий фактор представляет собой смесь 7 М раствора мочевины

и 40 % деионизованного формамида). Электрофорез вели при 60 °С в однократном ТАЕ буфере сначала при напряжении 50 В в течение 1 ч, а затем 100В в течение 16 ч. По окончании электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и получали цифровые изображения в УФ (302 нм) на приборе AlphaImager (Alpha Innotech Corp., США). Цифровые изображения гелей обрабатывали в пакете программ AlphaEase v5.5 (Alpha Innotech Corp., США), используя модуль денситометрического анализа 1D-Multi. Результаты обработки представлены в виде относительной плотности отдельных полос ДНК в процентах от их суммарной плотности (100 %) в каждом отдельном образце. По относительным расстояниям пробега в геле идентифицированы одинаковые для разных образцов полосы ДНК и определено их общее количество. Для проведения кластерного анализа построена матрица данных, учитывающая относительную плотность каждой из зарегистрированных полос ДНК в каждой исследуемой пробе. Порог детекции наличия вида в сообществе методом ДГГЭ составляет не менее 1 % [6].

Статистический анализ. Для оценки разнообразия бактериального сообщества в микрорекосистемах вычислены два общепринятых индекса [24]: индекс изобилия видов Шеннона $H = -\sum p_i(\log_2 p_i)$ и индекс равномерности и доминантности Симпсона $D = \sum p_i^2$, где p_i – относительная интенсивность i -й полосы в образце, пропорциональная относительной численности вида в сообществе [25].

Кластерный анализ матриц гелей выполнен по методу одного звена с использованием евклидовых расстояний [26]. В качестве осей гиперпространства использовались относительные интенсивности плотности полос ДНК. Все вычисления сделаны с помощью программного обеспечения STATISTICA, версия 9 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Денситометрический анализ профиля бактериальных сообществ I–III экспериментов выявил 71 фрагмент ДНК, которые занимали разные положения на геле и соответствовали разным бактериальным видам (рис. 1).

Среди этих видов 9 отмечены в I, II и III экспериментах, 8 были общими только для бактериальных сообществ I и II экспериментов, один вид был общим только для I и III экспериментов и 3 вида встречались только во II и III экспериментах (см. рис. 1). Для I эксперимента характерны 22 вида, не встречавшиеся более ни во II, ни в III экспериментах. В бактериальном сообществе во II эксперименте обнаружено 12 таких уникальных видов, а в III эксперименте – 16. Наибольшими колебаниями разнообразия видового состава бактериопланктона, согласно значениям индекса разнообразия Шеннона, отличался эксперимент I (см. таблицу), однако в целом во всех трех экспериментах вариабельность была незначительной.

В исходной пробе эксперимента I (см. рис. 1, дорожка I–0) отмечено 28 полос ДНК, соответствующих различным видам бактерий. В эксперименте I по данным денситометрии в сообществе бактериопланктона МЭС через сутки после добавки лизина возросла доля вида *Lys1* до 10,3 % по сравнению с 5,4 % в исходной пробе (см. рис. 1, дорожка I–1). На 2-е сут доля вида *Lys2* (см. рис. 1, дорожка I–2) возросла до 8,6 % по сравнению с ≤ 1 % в исходной пробе (см. рис. 1, дорожка I–0). К концу эксперимента на 5-е сут доли *Lys1* и *Lys2* снизились до 7,7 и 2 % соответственно (см. рис. 1, дорожка I–5). Через 4 сут после добавления субстрата появился не наблюдавшийся в исходной пробе вид Ia (см. рис. 1, дорожка I–4), доля которого составила 11,5 % и возросла на 5-е сут до 17,9 %. Динамика остальных видов бактериопланктона в сообществе МЭС не имела характерных особенностей. Можно отметить, что число видов бактерий снижалось по сравнению с исходной пробой с 1-х по 3-и сут эксперимента I, а затем снова начало возрастать (см. таблицу).

В исходной пробе эксперимента II (см. рис. 1, дорожка II–0) отмечен 21 вид бактерий. По данным денситометрии в сообществе бактериопланктона после добавки лизина наблюдалось увеличение доли вида IIa с максимумом на 2-е сут (см. рис. 1, дорожка II–2) до 16,7 % по сравнению с 8,5 % в исходной пробе. На 2-е сут доля вида IIb выросла до 10,2 % по сравнению с 9,4 % в исходной про-

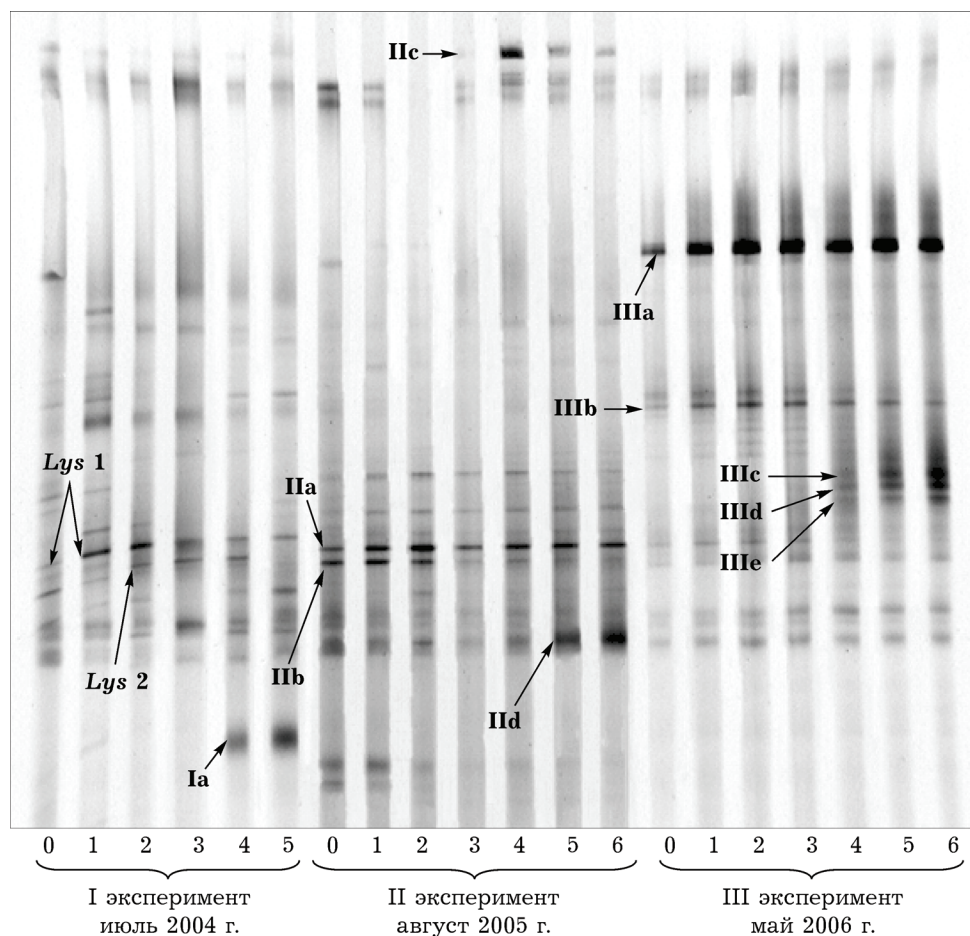


Рис. 1. ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из микрэкосистем экспериментов I, II и III. Номер дорожки соответствует суткам эксперимента. Стрелки указывают на виды, обсуждаемые в тексте

бе (см. рис. 1, дорожка II-2). В последующие дни доля этих видов постепенно снижалась. Через 3 сут после добавления лизина появился не наблюдавшийся в исходной пробе вид IIc (см. рис. 1, дорожка II-3), доля которого составила 2,5 % и возросла на 4-е сут до 11,1 %. Необходимо уточнить, что метод ДГГЭ позволяет обнаружить виды, численность которых в сообществе составляет более 1 % [6], поэтому появление новых полос ДНК на “профиле” сообщества свидетельствует, как правило, не о появлении нового вида, а об увеличении его численности до определяемой величины. На 5-е сут в сообществе появился новый доминант – вид IId (см. рис. 1, дорожка II-5), доля которого достигла 10,1 %. Число видов бактерий незначительно колебалось по сравнению с исходной пробой, но на 4-е сут после добавления субстрата зарегистрирован максимум – 26 ви-

дов (см. таблицу). Весьма вероятно, что это связано с повышением на 3 °С температуры воды в МЭС, вызванным сбоем системы охлаждения, поскольку в других экспериментах такого не наблюдалось.

В исходной пробе эксперимента III (см. рис. 1, дорожка III-0) отмечено 23 вида бактерий. По данным денситометрии в сообществе бактериопланктона МЭС наблюдался единственный доминант – вид IIIa (см. рис. 1, дорожка III-1), доля которого в исходной пробе составила 21,8 %, а после добавки лизина на 2-е сут выросла до 24,6 % и затем постепенно снижалась до начального уровня. Доля вида IIIb (см. рис. 1, дорожка III-1) несколько выросла по сравнению с исходной пробой и достигла максимума 7,4 % на 2-е сут после внесения субстрата. На 4-е сут отмечено появление трех новых видов IIIc, IIId, IIIe, доли которых выросли к концу экс-

Экологические параметры экспериментальных микрэкосистем

Дата отбора пробы	Номер пробы	Температура воды, °С	Число полос на ДГГЭ-геле	Индекс Шеннона (H)	Индекс Симпсона (D)
<i>Эксперимент I</i>					
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
ΣD	—	—	—	0,214	0,010
<i>Эксперимент II</i>					
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
ΣD	—	—	—	0,143	0,007
<i>Эксперимент III</i>					
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
ΣD	—	—	—	0,126	0,005
<i>Эксперимент IV</i>					
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
ΣD	—	—	—	0,231	0,014

Примечание. SD – стандартное отклонение.

перимента (см. рис. 1, дорожка III–4). Число видов бактерий в отдельные дни эксперимента по сравнению с исходной пробой колебалось незначительно (см. таблицу).

Результаты кластерного анализа видового разнообразия бактериальных сообществ из экспериментов I, II, III представлены на рис. 2. Можно отметить образование трех чет-

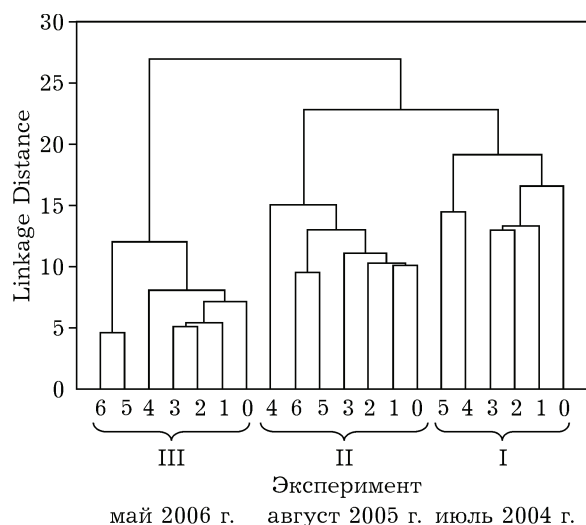


Рис. 2. Кластерный анализ ДГГЭ-геля с образцами из экспериментальных микроэкосистем экспериментов I, II и III

ко выраженных кластеров, соответствующих отдельным экспериментам. При этом сообщество майского эксперимента III наиболее сильно отличалось от таковых двух других экспериментов, проведенных летом. Внутри кластеров прослеживается характерная тенденция изменения состава бактериального сообщества в ходе отдельных экспериментов. В кластере, объединяющем образцы эксперимента II, несколько выделяется лишь образец 4-х сут, который отличался высоким значением индекса Шеннона и, следовательно, большим разнообразием сообщества, чем остальные образцы из этого эксперимента (см. таблицу).

Динамика видового состава бактериопланктона в эксперименте IV представлена на рис. 3. В целом в IV эксперименте выявлено 38 фрагментов ДНК, занимающих разное положение на геле и соответствующих разным бактериальным видам. Индексы разнообразия Шеннона в этом эксперименте имели более низкие значения и варьировали значительно сильнее, чем во II–III экспериментах (см. таблицу). Для сравнения на том же геле поместили образец, соответствующий 2-м сут из эксперимента I (см. рис. 3, дорожка I–2). В исходной пробе эксперимента IV обнаружено 20 полос ДНК, соответствующих различным бактериальным видам (см. таблицу), среди них отмечено 2 доминантных вида бак-

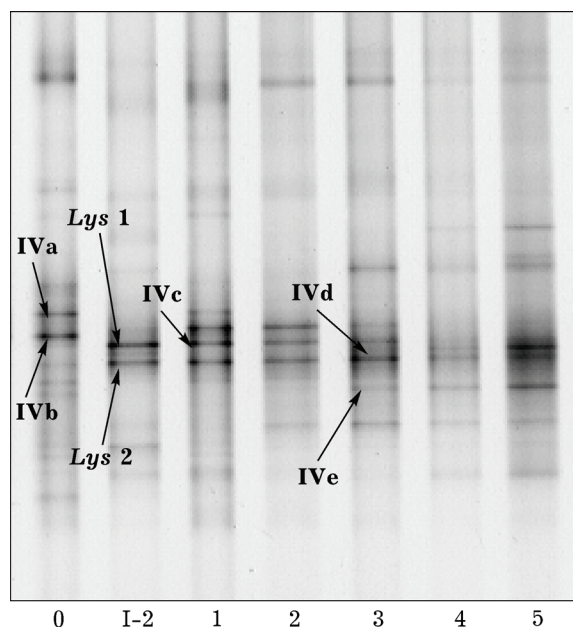


Рис. 3. ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из микроэкосистемы эксперимента IV (дорожки 0–5). Номер дорожки соответствует суткам эксперимента. Стрелки указывают на виды, обсуждаемые в тексте. Для сравнения на дорожке I–2 представлен образец из МЭС эксперимента I (2-е сут) с полосами ДНК, соответствующими видам *Lys1* и *Lys2*

терий IVa и IVb с относительными долями 11,2 и 13,9 % соответственно (см. рис. 3, дорожка 0). После добавления лизина доля этих видов резко снизилась и доминирующее положение в сообществе МЭС заняли виды *Lys1*, *Lys2* и вид IVc, не выявлявшийся в исходной пробе (см. рис. 3, дорожка 1). Доли видов IVc и *Lys1* достигли максимального значения через сутки после внесения субстрата, увеличившись с ≤ 1 до 13,9 % и с 5,5 до 13,7 % соответственно. Вид *Lys2* занял доминирующее положение в бактериальном сообществе на 3-и сут эксперимента с 14,1 % относительной доли среди всех видов по сравнению с 5,4 % в исходной пробе (см. рис. 3, дорожка 3). На 3-и сут после добавления субстрата в сообществе МЭС появились не наблюдавшиеся в исходной пробе виды IVd и IVe (см. рис. 3, дорожка 3), доли которых выросли к концу эксперимента до 10,4 и 9,2 % соответственно. Динамика остальных видов бактериопланктона в сообществе МЭС в IV эксперименте не имела каких-либо характер-

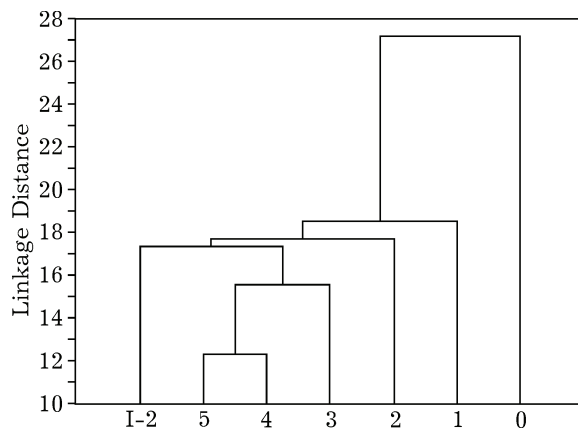


Рис. 4. Кластерный анализ ДГГЭ-геля с образцами из МЭС эксперимента IV (0–5) и образца I–2 (2-е сут эксперимента I)

ных особенностей. Число видов бактерий снизилось по сравнению с исходной пробой и испытывало значительные колебания (см. таблицу).

Кластерный анализ результатов IV эксперимента представлен на рис. 4. Наиболее отличающейся от всех остальных оказалась исходная проба 0, что свидетельствует о существенном изменении состава бактериопланктона МЭС после добавления лизина (см. рис. 4). Важно отметить, что видовой состав бактериопланктона в эксперименте I (образец I–2) имел сильное сходство с видовым составом проб эксперимента IV (см. рис. 4).

Ранее нами установлено, что в летнем эксперименте 2004 г. (эксперимент I) на добавление лизина реагировало не все сообщество бактериопланктона, а лишь небольшое число видов (генотипов), имевших в исходной пробе сравнительно низкую долю [11]. При этом на добавление другой аминокислоты, глицина, откликнулись другие виды бактерий, а в контрольной МЭС по данным денситометрии ДГГЭ численность и тех и других видов не изменялась. На основании этих результатов выдвинуто предположение об узкой специализации видов свободноживущего некультивируемого бактериопланктона по способности к потреблению определенных аминокислот.

В экспериментах I–IV потребление лизина другими видами бактериопланктона: Ia, IIa, IIb, IIc, IId, IIIa, IIIb, IIIc, IIId, IIIe (см. рис. 1), IVa, IVb, IVc, IVd, IVe (см.

рис. 3), несмотря на существенную положительную динамику их интенсивности после добавления субстрата, не является доказанным. Таким образом, видами, потребляющими лизин, являются бактерии *Lys1* и *Lys2* [11]. Последовательность нуклеотидов гена 16S рРНК вида *Lys1* (номер депонирования в GenBank HM072087) на 100 % идентична некультивируемой бактерии семейства Burkholderiaceae (*Polynucleobacter* sp.) филогенетической группы Betaproteobacteria. Вид *Lys2* (номер депонирования HM072086) на 99 % идентичен штамму *Limnobacter thiooxidans* того же семейства Burkholderiaceae. Снижение численности изначально увеличивших свою долю в сообществе МЭС I эксперимента бактериальных популяций *Lys1* и *Lys2* вряд ли произошло по причине истощения запасов лизина. В наших экспериментах и экспериментах некоторых других авторов [9] аминокислоты добавлялись в избыточном количестве, чтобы избежать лимитирования роста бактерий. Возможны две причины уменьшения численности этих поначалу активно растущих популяций. Во-первых, уменьшение численности быстрорастущих бактерий могло быть связано с выеданием их простейшими. Действительно, выедание играет ключевую роль в формировании морфологического, генотипического и фенотипического состава бактериальных сообществ, и менее активные клетки выживают с большей вероятностью, чем растущие продуктивные клетки, не выработавшие механизмы устойчивости к выеданию [27]. Во-вторых, убыль быстрорастущих популяций может быть связана с видоспецифическим лизисом вирусами [9]. В целом динамика бактериальных сообществ в микросистемах, а именно быстрый отклик популяций, слабо выраженных в исходной пробе на профиле геля, и устойчивость природных популяций в течение эксперимента в контрольных МЭС [11] хорошо согласовывались с результатами подобных экспериментов в обогащенных питательными веществами морских мезокосмах [6].

Полученные результаты позволяют выдвинуть предположение о межгодовой устойчивости летнего бактериального сообщества. Одни и те же виды бактерий *Lys1* и *Lys2* откликнулись на добавки лизина в июле 2004

и в начале августа 2009 г. Возможно, сезонная динамика бактериопланктона из года в год может повторяться. Это предположение необходимо проверить дальнейшими экспериментами.

Значения индексов Шеннона и Симпсона в наших экспериментах были близки значениям, полученным другими авторами [9]. Отметим, что разнообразие бактериальных сообществ, описываемое индексом Шеннона, слабо менялось в течение экспериментов в микроэкосистемах (см. таблицу). Так, в IV эксперименте снизившееся после добавки лизина видовое разнообразие вернулось на исходный уровень к концу эксперимента. Однако вариабельность индексов разнообразия (SD) во II и III экспериментах была гораздо ниже, чем в I и IV экспериментах. Таким образом, в июле и начале августа сообщества бактериопланктона отреагировали на добавку лизина более сильным и устойчивым изменением видового состава, а в мае и конце августа такого отклика не наблюдалось. Одной из возможных причин этого явления может быть отличие видового состава весеннего и позднелетнего бактериопланктона водохранилища от летнего сообщества бактерий. Вероятно, весной и поздним летом бактерии, специализирующиеся на потреблении лизина, в сообществе отсутствовали или были функционально неактивны. Например, в эксперименте II вид *Lys1* ежедневно регистрировали на профиле ДГГЭ с относительной долей около 5 %, но его роста в сообществе не происходило (см. рис. 1). Так, низкая температура воды или иные физические факторы весной и поздним летом могли препятствовать размножению бактериопланктона, потребляющего данную аминокислоту, хотя другие его виды успешно росли и при относительно низких температурах. Для более детального выяснения причин различий между результатами весенне-позднелетних и летних экспериментов необходимо провести определение филогенетической принадлежности видов бактериопланктона, присутствовавших в МЭС.

Помимо физических факторов на разнообразие и физиологическую активность бактериопланктона могли влиять и биотические,

такие как состав фитопланктонного сообщества. В майском фитопланктоне водохранилища Бугач доминируют диатомовые водоросли, тогда как в середине и конце лета доминантами становятся колониальные и нитчатые цианобактерии, а также перидиниевые водоросли [12, 16, 28]. Вероятно, динамика фитопланктона в течение вегетационного периода оказывает влияние на сезонный состав и активность бактериопланктона. Как известно, водные гетеротрофные бактерии могут зависеть от продуктов прижизненных и посмертных выделений фитопланктона.

Предполагаемая узкая специализация видов бактериопланктона в потреблении конкретных органических веществ и отсутствие в сообществе специализированных видов или их низкая активность в некоторые сезоны могут иметь значение для понимания процессов самоочищения экосистемы водоема от органических загрязнений. Действительно, когда в водоеме отсутствуют виды, способные утилизировать загрязняющее вещество, экосистема становится особенно уязвимой к антропогенному загрязнению. Например, в наших экспериментах по изучению динамики самоочищения экосистемы водохранилища от фенола, проведенных в МЭС по той же методике, что и изучение потребления аминокислот, выявлено, что в летние месяцы добавленный в МЭС фенол полностью утилизировался за 2–5 сут, тогда как в мае он не потреблялся в течение 10 дней [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Добавление лизина в микроэкосистемы приводило к изменению структуры летнего бактериопланктона, а именно в бактериальном сообществе резко увеличивалась численность видов (генотипов) *Lys1* и *Lys2*, потребляющих данную аминокислоту. Весенние и позднелетние планктонные сообщества бактерий никак не реагировали на добавки лизина. Полученные данные подтверждают гипотезу об узкой специализации видов бактериопланктона к потреблению отдельных органических веществ и дают основание предполагать, что способность экосистемы водоема

к самоочищению от тех или иных загрязняющих органических веществ может существенно зависеть от сезонной сукцессии бактериального сообщества.

ЛИТЕРАТУРА

1. Giovannoni S., Stingl U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton // *Nature*. 2005. Vol. 437. P. 343–348.
2. Fuhrman J. A., Steele J. A. Community structure of marine bacterioplankton: patterns, networks, and relationships to function // *Aquat. Microb. Ecol.* 2008. Vol. 53. P. 69–81.
3. Mou X., Sun S., Edwards R. A., Hodson R. E., Moran M. A. Bacterial carbon processing by generalist species in the coastal ocean // *Nature*. 2008. Vol. 451. P. 708–711.
4. Buck U., Grossart H.-P., Amann R., Pernthaler J. Substrate incorporation patterns of bacterioplankton populations in stratified and mixed waters of a humic lake // *Environmental Microbiology*. 2009. Vol. 11, N 7. P. 1854–1865.
5. Ouverney C. C., Fuhrman J. A. Marine planktonic Archaea take up amino acids // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. P. 4829–4833.
6. Schäfer H., Bernard L., Courties C., Lebaron P., Servais P., Pukall R., Stackebrandt E., Troussellier M., Guindulain T., Vives-Rego J., Muyzer G. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001. Vol. 34. P. 243–253.
7. Carlson C. A., Giovannoni S. J., Hansell D. A., Goldberg S. J., Parsons R., Otero M. P., Vergin K., Wheeler B. R. Effect of nutrient amendments on bacterioplankton production, community structure, and DOC utilization in the northwestern Sargasso Sea // *Aquat. Microb. Ecol.* 2002. Vol. 30. P. 19–36.
8. Zubkov M. V. Differential microbial uptake of dissolved amino acids and amino sugars in surface waters of the Atlantic Ocean // *J. of Plankton Research*. 2008. Vol. 30, N 2. P. 211–220.
9. Øvreås L., Bourne D., Sandaa R. A., Casamayor E. O., Benlloch S., Goddard V., Smerdon G., Heldal M., Thingstad T. F. Response of bacterial and viral communities to nutrient manipulations in seawater mesocosms // *Aquat. Microb. Ecol.* 2003. Vol. 31. P. 109–121.
10. Rosenstock B., Simon M. Sources and sinks of dissolved free amino acids and protein in a large and deep mesotrophic lake // *Limnol. Oceanogr.* 2001. Vol. 46, N 3. P. 644–654.
11. Колмакова О. В., Трусова М. Ю. Потребление аминокислот некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища // *Сиб. экол. журн.* 2011. № 1. С. 13–21.
12. Kalachova G. S., Kolmakova A. A., Gladyshev M. I., Kravchuk E. S., Ivanova E. A. Seasonal dynamics of amino acids in two small Siberian reservoirs dominated by prokaryotic and eukaryotic phytoplankton // *Aquat. Ecol.* 2004. Vol. 38. P. 3–15.
13. Fox J. M., Lawrence A. M., Li-Chang E. Dietary requirement for lysine by juvenile *Penaeus vannamei* using intact and free amino acids sources // *Aquaculture*. 1995. Vol. 131. P. 279–290.
14. Schuhmacher A., Wax C., Gropp J. M. Plasma amino acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed intact protein or a crystalline amino acid diet // *Ibid.* 1997. Vol. 151. P. 15–28.
15. Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Kolmakova A. A., Kalachova G. S., Kravchuk E. S., Ivanova E. A., Makhutova O. N. Seasonal correlations of elemental and $\omega 3$ PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir // *Aquat. Ecol.* 2007. Vol. 41. P. 9–23.
16. Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Makhutova O. N., Dubovskaya O. P., Kravchuk E. S., Kalachova G. S., Khromechek E. B. Correlations between fatty acid composition of seston and zooplankton and effects of environmental parameters in a eutrophic Siberian reservoir // *Limnologica*. 2010. Vol. 40. P. 343–357.
17. Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Anishchenko O. V., Makhutova O. N., Kolmakov V. I., Kalachova G. S., Kolmakova A. A., Dubovskaya O. P. Efficiency of transfer of essential polyunsaturated fatty acids versus organic carbon from producers to consumers in a eutrophic reservoir // *Oecologia*. 2011. Vol. 165. P. 521–531.
18. Kravchuk E. S., Ivanova E. A., Gladyshev M. I. Spatial distribution of resting stages (akinetes) of the cyanobacteria *Anabaena flos-aquae* in sediments and its influence on pelagic populations // *Marine and Freshwater Research*. 2011. Vol. 62. P. 450–461.
19. Gladyshev M. I., Sushchik N., Kalachova G. S., Shchur L. A. The effect of algal blooms on the disappearance of phenol in a small forest pond // *Water Research*. 1998. Vol. 32, N 9. P. 2769–2775.
20. Сущик Н. Н., Гладышев М. И., Калачева Г. С., Плаксина И. В. Динамика биомассы микроводорослей и состава внеклеточных свободных жирных кислот в экспериментальных микроэкосистемах // *Изв. РАН. Сер. биол. наук*. 1998. № 6. С. 738–744.
21. Гладышев М. И. Экспериментальные экосистемы и их применение для изучения биодеградации легкоокисляемых токсикантов в пелагиали (обзор) // *Гидробиол. журн.* 1992. Т. 28, № 5. С. 68–77.
22. Böstrom K. H., Simu K., Hagstrom A., Riemann L. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis // *Limnol. Oceanogr.: Methods*. 2004. Vol. 2. P. 365–373.
23. Schauer M., Massana R., Pedros-Alio C. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. Vol. 33. P. 51–59.
24. Hill T. C. J., Walsh K. A., Harris J. A., Moffett B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities // *Ibid.* 2003. Vol. 43. P. 1–11.
25. Dunbar J., Takala S., Barns S. M., Davis J. A., Kuske C. R. Levels of bacterial community diversity in four

- arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning // *Appl. Environ. Microbiol.* 1999. Vol. 65. P. 1662–1669.
26. Джефферс Дж. Введение в системный анализ: применение в экологии. М.: Мир, 1981.
27. Lebaron P., Servais P., Troussellier M., Courties C., Muyzer G., Bernard L., Schäfer, H., Pukall R., Stackebrandt E., Guindulain T., Vives-Rego J. Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in abundances, activity and composition // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001. Vol. 34. P. 255–266.
28. Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Dubovskaya O. P., Makhutova O. N., Kalachova G. S. Growth rate of *Daphnia* feeding on seston in a Siberian reservoir: the role of essential fatty acid // *Aquat. Ecol.* 2008. Vol. 42. P. 617–627.

Seasonal Features of the Consumption of Lysine by Uncultivated Bacterial Plankton of an Eutrophic Water Reservoir

M. Yu. TRUSOVA¹, O. V. KOLMAKOVA^{1,2}, M. I. GLADYSHEV^{1,2}

¹ *Institute of Biophysics SB RAS*
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok, 50, build. 50

² *Siberian Federal University*
660041, Krasnoyarsk, Svobodniy ave., 79

Dynamics of the bacterial plankton community of an eutrophic water reservoir was studied by means of PCR-DGGE in laboratory microecosystems with the addition of amino acid lysine. The data obtained confirm the hypothesis of the narrow specialization of bacterial plankton species to the consumption of separate organic substances.

Key words: denaturing gradient gel electrophoresis, microecosystem (MES), uncultivated bacterial plankton, lysine, biogeochemical function, eutrophic water reservoir, 16S ribosomal RNA.