

## Экологические факторы и денитрифицирующие бактерии эпилитона озера Байкал

А. С. ГОРШКОВА, Г. В. ПОДЛЕСНАЯ, Н. А. ЖУЧЕНКО, И. В. ТИХОНОВА,  
М. Ю. СУСЛОВА, Ю. Р. НЕБЕСНЫХ, Е. А. ЗИМЕНС, О. И. БЕЛЫХ

Лимнологический институт СО РАН  
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
E-mail: podlesnaya@lin.irk.ru

Статья поступила 01.03.2023

После доработки 15.06.2023

Принята к печати 16.06.2023

### АННОТАЦИЯ

Эпилитные биопленки играют важную роль в водоемах, участвуя в круговороте питательных веществ. Денитрификация активно протекает в эпилитоне водоемов. Однако информация об экологических факторах, влияющих на данный процесс в биопленках, весьма ограничена. В настоящей работе исследована численность культивируемых денитрифицирующих бактерий в биопленках, сформированных на каменистых субстратах, в различных районах лitorали оз. Байкал. Выявлено, что основными факторами, объясняющими различия в количестве культивируемых бактерий, осуществляющих полную денитрификацию, были температура и концентрация общего азота в придонном слое воды. Показано, что меньшее количество денитрификаторов характерно для биопленок, испытывающих дефицит азота, на что указывало низкое стехиометрическое соотношение N : P в биопленках. Определено неравномерное распределение тяжелых металлов в биомассе эпилитных биопленок, что также может потенциально влиять на денитрификацию в эпилитоне оз. Байкал.

**Ключевые слова:** культивируемые гетеротрофные денитрифицирующие бактерии, эпилитон, факторы денитрификации, экологическая стехиометрия.

### ВВЕДЕНИЕ

Денитрификаторы – микроорганизмы способные в условиях дефицита кислорода осуществлять дыхание на нитратах, т. е. окисление органических веществ с помощью кислорода нитратов. В результате этого процесса образуются газы N<sub>2</sub> или N<sub>2</sub>O [Gaimster et al., 2018]. Известно, что избыточное поступление азота является одним из основных факторов эвтрофикации и ухудшения качества воды водоемов [Malone, Newton, 2020]. Денитрификация удаляет связанный азот из во-

доема, тем самым способствуя уменьшению эвтрофирования. Причем денитрификация является важным процессом, который приводит к значительным переносам азота в атмосферу из внутренних вод в глобальном масштабе [Boyer et al., 2006; Seitzinger et al., 2006]. Двумя наиболее важными катаболическими процессами, значительно изменяющими стехиометрию внутренних вод за счет эмиссии газов, являются дыхание и денитрификация [Maranger et al., 2018]. Лучшие условия для денитрификации в насыщенных кислород-

дом водоемах создаются в верхнем слое осадков [McClain et al., 2003; Seitzinger et al., 2006]. В осадках оз. Байкал также показано протекание денитрификации [Романова, 1961]. В озерах сообщества эпилитона могут быть “горячими” точками денитрификации [Magalhães et al., 2005]. Преимуществом эпилитных биопленок перед осадками является активная продукция органического вещества, необходимого для протекания гетеротрофной денитрификации. Кроме того, известно, что эпилитон активно поглощает различные формы азота и восстанавливает его до  $N_2O$  и  $N_2$ , что способствует биоремедиации и поддержанию олиготрофных условий [Teissier et al., 2002, 2007; Ribot et al., 2012; Sanli et al., 2015; Bernal et al., 2018]. Изучению денитрификации в эпилитоне – биопленках на каменистых субстратах, выстилающих значительную часть литорали, посвящено меньше исследований по сравнению с осадками. В эпилитных биопленках литоральной зоны оз. Байкал обнаружены денитрифицирующие бактерии *nirK*-типа, родственные с некультивируемыми бактериями порядков *Rhizobiales* и *Rhodobacterales* класса *Alphaproteobacteria* [Подлесная и др., 2020]. Также показано, что численность культивируемых денитрификаторов в эпилитных биопленках литорали оз. Байкал может достигать высоких значений [Подлесная и др.,

2021]. Однако о факторах, определяющих эффективность денитрификации в эпилитоне, известно немного [Lyautey et al., 2013]. Кроме того, в различных местообитаниях наблюдается широкий диапазон физико-химических условий, поэтому в каждом конкретном районе, вероятно, будет свой ограничивающий фактор или несколько факторов денитрификации. Цель данной работы – определение численности денитрифицирующих бактерий в литоральном эпилитоне оз. Байкал и рассмотрение экологических факторов, объясняющих различия в их количестве.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Район исследования и отбор проб

Отбор проб воды и биопленок с каменистых субстратов проведен в районе западного побережья оз. Байкал (рис. 1) напротив пос. Листвянка (St1), пос. Большие Коты (St2), пос. Большое Голоустное (St3) и в проливе Ольхонские Ворота (St4) в период с 5 по 14 августа 2019 г. Глубина озера в местах отбора составляла от 10 до 15 м. Образцы воды отбирали батометром Нискина, каменистые субстраты с биопленками со дна поднимали водолазы. Для химического анализа пробы воды фильтровали через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор

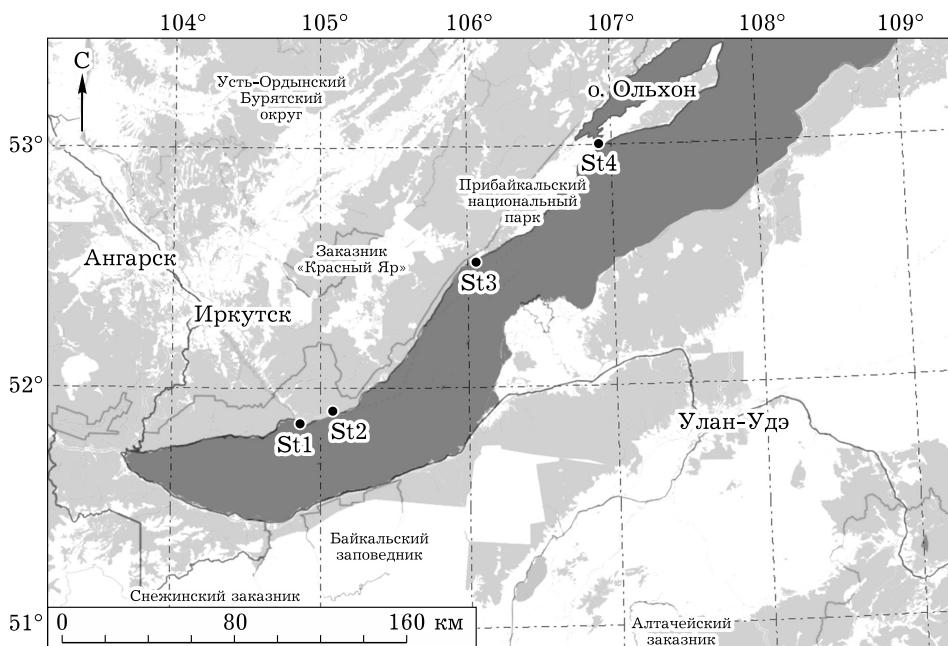


Рис. 1. Расположение станций отбора проб: St1 – напротив пос. Листвянка, St2 – напротив пос. Большие Коты, St3 – напротив пос. Большое Голоустное, St4 – пролив Ольхонские Ворота.

0,45 мкм (“Владисарт”, Россия). Далее фильтрованные и нефильтрованные пробы для определения биогенных элементов замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Биопленки с камней немедленно после отбора собирали с помощью стерильного скальпеля. Одну аликвоту биопленки высушивали при  $42^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса, другую замораживали при  $-20^{\circ}\text{C}$  для определения концентрации хлорофилла *a*.

### **Микробиологический, микроскопический и химический анализы эпилитных биопленок**

Численность денитрификаторов определяли путем посева суспендированной биопленки методом десятикратных разведений. Для этого использовали жидкую среду Гильтая (г/л): готовили раствор I ( $\text{KNO}_3$  – 2,0,  $\text{H}_2\text{O}$  – 250 мл) и раствор II ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,0,  $\text{CaCl}_2$  – 0,2, натрий лимоннокислый – 2,5,  $\text{FeCl}_3$  – следы,  $\text{H}_2\text{O}$  – 500 мл), оба раствора сливали в колбу и доводили объем до 1000 мл. По индикатору бромтимоловому синему устанавливали pH, равным 7 [Родина, 1965]. В пробирки со средой помещали пробирки Дарема (Durham Marienfeld, UK) для фиксации газообразования. По окончании опыта регистрировали следующие признаки: 1) накопление газа, 2) изменение цвета среды с зеленого на синий, что указывало на изменения pH в щелочную сторону. Количество денитрифицирующих бактерий определяли как наиболее вероятное число клеток в изначальном образце и обозначали кл/см<sup>2</sup> или кл/г сырого веса. Анализировали три отдельных камня с каждой станции. Культивируемые гетеротрофные бактерии учитывали на среде РПА10 [Горбенко, 1961]. Биопленки высушивали в течение 12 ч при  $55^{\circ}\text{C}$  и покрывали в вакууме золотом на SCD 004 установке (Balzers AG, Лихтенштейн). Сканирующую электронную микроскопию выполняли на микроскопе Quanta 200 (FEI Company, США) при напряжении 29 кВ. Содержание хлорофилла *a* определяли спектрофотометрически с использованием метанольной экстракции в течение 12 ч при  $8^{\circ}\text{C}$  [Неприкас et al., 2007]. Адсорбцию экстракта измеряли при длине волны 665 нм.

Содержание углерода и азота определяли в высушенных на воздухе образцах биопленок

на CHN-анализаторе в ЦКП ИрИХ СО РАН (Flash EA 1112 CHNS, ThermoFinigan, Италия). Также из этих образцов была приготовлена суспензия в дистиллированной воде с расчетом, чтобы содержание органического фосфора не превышало 1 мг/л. Общий фосфор в образцах полученных суспензий определяли методом персульфатного сжигания согласно рекомендациям пробоподготовки, представленных в работах M. Kahlert et al. [2002], P. Qin et al. [2007], A. Liess et al. [2009], с последующим фотометрическим методом восстановления хлористым оловом по ГОСТ 18309-2014, метод “Г”. Содержание фосфора в суспензии пересчитывали на содержание в граммах сухого веса эпилитных биопленок. Концентрации всех трех элементов – углерода, азота, фосфора – переводили в молярную размерность.

Элементный состав высушенных образцов определяли с помощью масс-спектрометра с индуктивно связанный плазмой Agilent 7500ce после кислотного разложения по ПНД Ф 16.1:2.3:3.11-98 (издание 2015 г.).

### **Гидрохимический анализ придонной воды**

В фильтрованных пробах воды определяли концентрацию следующих элементов: нитрат-иона ( $\text{NO}_3^-$ ) – фотометрическим методом с использованием салициловокислого натрия по ГОСТ 33045-2014 (метод “Д”), нитрит-ионов ( $\text{NO}_2^-$ ) – методом фотоколориметрии с реагентом Грасса по ГОСТ 33045-2014 (метод “Б”), ионов аммония ( $\text{NH}_4^+$ ) – индофенольным методом по РД 52.24.383, фосфат-ионов ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) – фотометрическим методом восстановления хлористым оловом по ГОСТ 18309-2014 (метод “А”). В нефильтрованных пробах воды определяли концентрацию общего фосфора фотометрическим методом восстановления хлористым оловом после окисления персульфатом калия по ГОСТ 18309-2014 (метод “Г”), общий азот определяли согласно РД 52.24.532-2016 (вариант 2), органическое вещество – методом бихроматного окисления (ХПК) с применением термореактора “Термион” (Люмэкс, Россия) и анализатора жидкости “Флюорат-02” (Люмэкс, Россия) согласно ПНД Ф 14.1:2:4.190-2003 в пересчете на углеродные единицы.

## Статистический анализ

Количественные данные по распределению денитрификаторов были  $\log_{10}$  трансформированы. Различия по распределению биомассы, количеству культивируемых денитрифицирующих бактерий, процентному содержанию элементов углерода, азота, фосфора протестированы с помощью непараметрического критерия Краскела – Уоллиса. Корреляцию между параметрами, измеряемыми в биопленке, определяли с помощью критериев Спирмена и Пирсона. Метод главных компонент применяли для анализа и визуализации взаимосвязи параметров окружающей среды и характеристик эпилитной биопленки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика эпилитных биопленок и придонного слоя воды лitorали оз. Байкал

Основу образцов эпилитных биопленок составляли нитчатые водоросли и цианобактерии (рис. 2). Между сухим, влажным весом и содержанием хлорофилла *a* выявлена положительная корреляция ( $r = 0,8–0,9$ ;  $p < 0,05$ ), что демонстрирует отсутствие значимых различий по содержанию терригенных частиц, детрита и фотоавтотрофных организмов в образцах.

Биомасса биопленок на разных станциях различалась значительно (тест Краскела – Уоллиса,  $p < 0,05$ ). На St1 и St4 биомасса биопленок на квадратный сантиметр площади камня была больше как по показателям сырого веса на квадратный сантиметр, так и по содержанию хлорофилла *a* на квадратный сантиметр. Соотношение хлорофилла *a* к сырому весу эпилитной биопленки в среднем составляло  $0,017 \pm 0,008\%$ . Согласно классификации G. Lakatos, биопленки с таким низким содержанием хлорофилла относятся к гетеротрофному типу [Lakatos, 1991].

Районы исследования различались по количеству культивируемых денитрифицирующих бактерий как по наиболее вероятному числу клеток на площадь в  $1\text{ см}^2$ , так и при пересчете на грамм влажного веса эпилитной биопленки (тест Краскела – Уоллиса,  $p < 0,05$ ). Наибольших значений  $6 \times 10^4\text{ кл}/\text{см}^2$  численность достигала в проливе Ольхонские Ворота (St4), что является максимальной для эпилитных биопленок оз. Байкал [Подлесная и др., 2021]. Минимальные значения выявлены на станции St2 у пос. Большие Коты –  $6\text{ кл}/\text{см}^2$ . Между биомассой на единицу площади биопленки и количеством денитрификаторов не было значимой зависимости.

Различия по содержанию углерода, азота и фосфора в эпилитоне между станциями не имели статистической значимости, так же как и молярное соотношение элементов C : P и C : N (тест Краскела – Уоллиса,  $p > 0,05$ ), однако молярная пропорция азота и фосфора (N : P) различалась значительно (тест Краскела – Уоллиса,  $p < 0,05$ ). Минимальное значение соотношения азота к фосфору в биомассе эпилитной биопленки найдено в районе пос. Листвянка (St1), а максимальное – в районе пролива Ольхонские Ворота (St4).

Такие элементы, как Cr, Zn, Cu, Pb, наблюдались в большей концентрации в биопленках у пос. Листвянка – St1.

Общий фосфор и азот в пробах нефильтрованной придонной воды на станциях St1 и St4 были в несколько большей концентрации, чем на станциях St2 и St3. Концентрации нитратного азота в придонной воде на станциях St1, St2, St3 в момент отбора

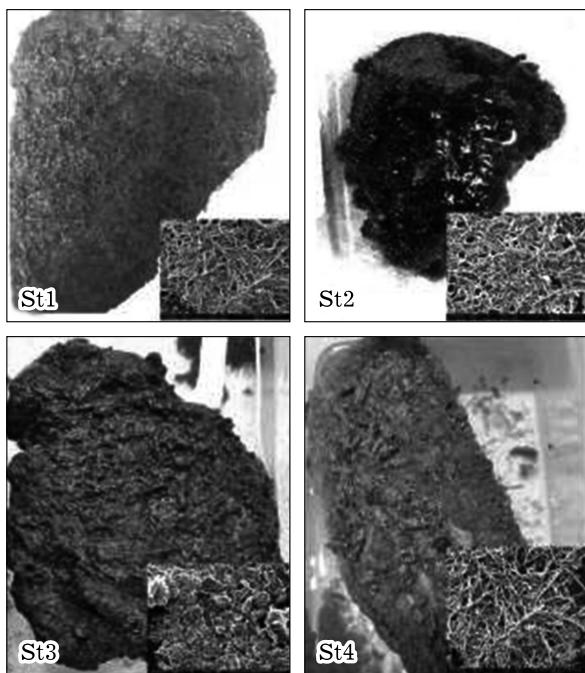


Рис. 2. Каменистые субстраты и эпилитные биопленки с различных станций отбора оз. Байкал. Общий вид камней и сканирующая электронная микроскопия высушенных образцов.

проб были близки между собой, но значительно отличались от станции St4. Температура придонного слоя воды на станциях St1 и St2 была ниже, чем на станциях St3 и St4 (таблица). Молярное соотношение общего азота к общему фосфору  $N_{\text{общ}}/P_{\text{общ}}$  в придонной воде на большинстве станций имело такой же тренд, как и соотношение этих элементов в эпилитных биопленках. Наименьшее значение  $N_{\text{общ}}/P_{\text{общ}}$  выявлено у пос. Листвянка (St1) и составило 15, на St2 – 20, St3 – 24 и St4 – 19. В биомассе эпилитных биопленок молярное соотношение азота к фосфору в среднем составило: St1 – 12, St2 – 17, St3 – 32, St4 – 29.

### Взаимосвязь факторов окружающей среды и параметров эпилитных биопленок

Выявлено, что количество денитрифицирующих бактерий в биопленках наиболее тес-

но связано с температурой и концентрацией общего азота в придонном слое воды ( $r = 0,6$  и  $0,7$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Между средними значениями стехиометрии N : P на различных станциях и количеством денитрификаторов на грамм сырого веса биопленки также обнаружена значимая корреляция ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,05$ ).

Анализ методом главных компонент показал, что различия между станциями отбора проб прежде всего обусловлены такими показателями, как денитрифицирующие бактерии, стехиометрия C : P и N : P в эпилитных биопленках, температура и общий азот в придонном слое воды, а также нитратный и фосфатный азот в придонной воде и концентрация тяжелых металлов в биопленках (рис. 3). Численность денитрификаторов в эпилитоне также тесно связана с такими факторами, как азот, температура и стехиометрия биопленок. Взаимосвязь их количества с толщиной биопленки,

**Гидрохимические характеристики придонной воды в месте отбора каменистых субстратов (мг/л), среднее содержание хлорофилла *a* и основных элементов в эпилитных биопленках на единицу площади**

Показатель	Rайон пос. Листвянка	Rайон пос. Большие Коты	Rайон пос. Большое Голоустное	Пролив Ольхонские Ворота
	St1	St2	St3	St4
Придонный слой воды, мг/л				
N[NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	0,06	0,07	0,04	0,01
N[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	0,007	0,003	0,005	0,001
N[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ]	0,001	0,000	0,001	0,001
P[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	0,004	0,005	0,003	0,002
P <sub>общ</sub>	0,012	0,008	0,007	0,012
C <sub>общ</sub>	5,3	5,4	3,7	3,6
N <sub>общ</sub>	0,18	0,16	0,17	0,23
Температура, °C	7	6	12	13
Эпилитные биопленки				
Хлорофилл <i>a</i> <sup>*</sup> , мкг/см <sup>2</sup>	34 (11)	27	14 (5)	42
Хлорофилл <i>a</i> <sup>*</sup> , мкг/г	339 (184)	446(16)	443(98)	370(11)
Сырой вес <sup>*</sup> , г/см <sup>2</sup>	0,25	0,07	0,05	0,30
C, мг/см <sup>2</sup>	8,22	4,3	2,67	9,77
N, мг/см <sup>2</sup>	0,99	0,62	0,48	1,00
P, мг/см <sup>2</sup>	0,150	0,082	0,026	0,050
$\Sigma$ Cd, Zn, Cu, Ni, Cr, Co, As, Pb <sup>**</sup> , мг/кг	346	180	207	70
Денитрифицирующие бактерии	3,0	2,5	4,0	4,7
$\frac{\log_{10}/\text{г сырого веса}}{\log_{10}/\text{см}^2}$	2,4	1,9	3,0	4,5

П р и м е ч а н и е. Данные в скобках – ±стандартное отклонение; \* – среднее, \*\* – медиана.

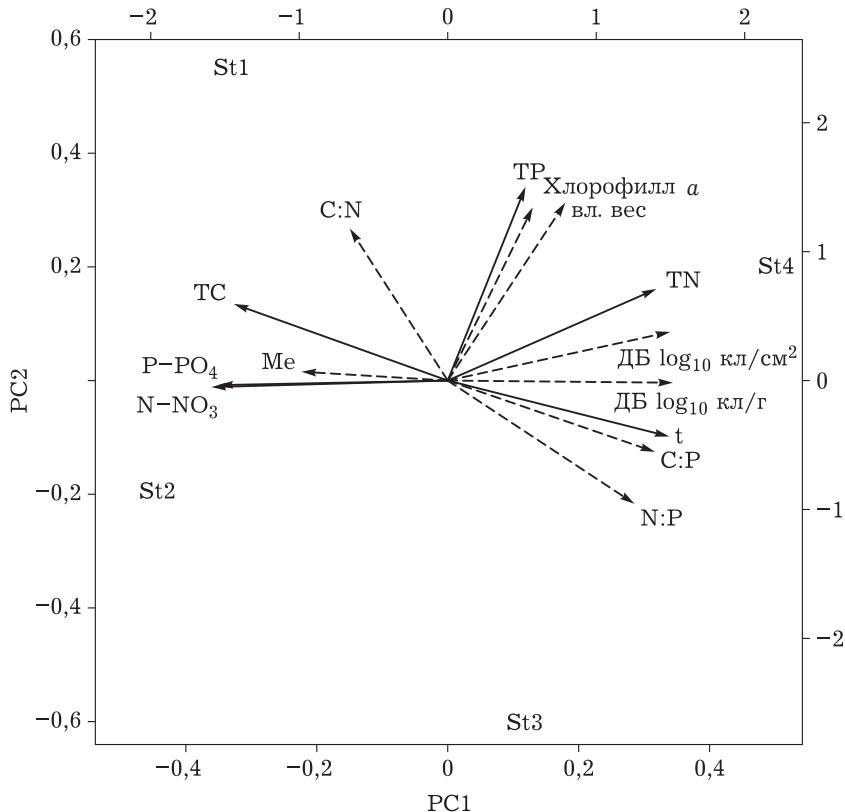


Рис. 3. Анализ методом главных компонент факторов окружающей среды (сплошные стрелки) и параметров биопленки (штриховые стрелки). ДБ – денитрифицирующие бактерии; Ме – суммарное количество микроэлементов Cd, Zn, Cu, Ni, Cr, Co, Pb, As, мкг/кг сухого веса эпилитной биопленки; ТС – общий углерод; ТР – общий фосфор; TN – общий азот; вл. вес – вес влажной биопленки, г/см<sup>2</sup>

выраженной как в концентрации хлорофилла, так и влажного веса на единицу площади камня, не выявлена. Однако толщина биопленки оказалась тесно связана с общим фосфором в вышележащем слое воды (рис. 3).

## ОБСУЖДЕНИЕ

### *Количество культивируемых гетеротрофных денитрификаторов отражает интенсивность процесса денитрификации*

Ферменты денитрификации не присутствуют в клетках постоянно, они синтезируются в ответ на уровень кислорода, монооксида азота, нитрата/нитрита, меди. Это справедливо по крайней мере на модельных бактериях *Paracoccus denitrificans* [Gaimster et al., 2018]. В питательной среде, использованной для подсчета денитрификаторов, созданы оптимальные условия для денитрификации, что стимулирует синтез соответствующих

ферментов. Следовательно, метод культивирования отражает потенциал микробного консорциума, но не денитрифицирующую активность в момент отбора проб. Таким образом, количество культивируемых денитрификаторов является косвенным индикатором интенсивности процесса денитрификации в различных районах.

Метод подсчета культивируемых денитрификаторов на среде Гильтая достаточно точно отражает протекающую в водоемах денитрификацию. Так, максимальные количества денитрифицирующих бактерий в озерах Архангельской области на среде Гильтая летом обнаруживались только в придонных слоях (0,5–1 м до донных отложений) при концентрации O<sub>2</sub> 0,5–0,9 мгO<sub>2</sub>/л и зимой при концентрации O<sub>2</sub> 0,1–0,2 мгO<sub>2</sub>/л. Численность денитрифицирующих бактерий составила 2500 и 600 кл/мл соответственно. Азотсодержащие неорганические вещества также обнаруживались в больших концентрациях в слое воды,

где выявлено большее количество культивируемых денитрификаторов [Воробьева и др., 2012]. Вместе с тем метод культивирования показал четкие различия между количеством денитрификаторов в толще воды и эпилитных биопленках оз. Байкал [Подлесная и др., 2021]. Таким образом, метод количественного определения культивируемых денитрифицирующих бактерий позволяет проводить сравнительное изучение интенсивности денитрификации в том или ином районе. Для определения более точной интенсивности денитрификации в момент отбора проб необходимо анализировать транскрипцию генов ферментов денитрификации.

***Количество культивируемых денитрифицирующих бактерий в эпилитных биопленках лitorали оз. Байкал определяет общий азот в придонном слое воды, а не нитрат***

Данное исследование не выявило положительной взаимосвязи между количеством денитрифицирующих бактерий эпилитных биопленок и концентрацией нитратного азота в придонной воде, однако обнаружена значимая положительная зависимость их численности от концентрации общего азота в придонной воде ( $r = 0,7$ ;  $p < 0,05$ ). Возможным поставщиком нитратов в эпилитной биопленке может быть нитрификация – сопряженный процесс [Teissier et al., 2002; Teissier, Torre, 2002]. Протекание нитрификации, которая поставляет нитрат денитрификаторам, объясняет отсутствие корреляции между количеством денитрификаторов и нитратом в вышележащем столбе воды. В тех же районах исследования, что и рассматриваются в данной работе, ранее найдено большое разнообразие таксонов бактерий, осуществляющих нитрификацию [Podlesnaya et al., 2020]. Отсутствие взаимосвязи между количеством генов *nirK*, *nirS* и параметрами окружающей среды, в том числе концентрацией  $\text{NO}_3^-$ , наблюдали для эпилитных биопленок высокогорных олиготрофных озер. В то же время обилие генов *nirK* и *nirS* в эпилитной биопленке положительно коррелировало с обилием бактериального и архейного гена *amoA*, что указывало на сопряженность денитрификации и нитрификации в эпилитоне [Vila-Costa et al., 2014].

***Экологическая стехиометрия и культивируемые денитрифицирующие бактерии***

В придонной воде и эпилитоне обнаружена схожая тенденция стехиометрии азота и фосфора – постепенное увеличение соотношения  $\text{N} : \text{P}$  от St1 к St4. Аналогичная картина наблюдалась в озерах Швеции между эпилитным N : P и пелагическим  $\text{N}_{\text{общ}}/\text{P}_{\text{общ}}$  [Diehl et al., 2018].

Соотношение углерода, азота и фосфора в обрастаниях могут быть подвержены изменениям в зависимости от факторов окружающей среды. Так, например, по мере увеличения общего фосфора биомасса перифитона увеличивалась, а соотношение C : P уменьшалось. Биомасса перифитона и соотношение C : P на свету были выше, чем в тени [Qin et al., 2007]. Сообщалось о положительной корреляции N : P стехиометрии и количества генов цикла азота в почве [Luo et al., 2020]. Содержание генов *nirS* в отложениях отрицательно коррелировало с соотношением C : N и положительно – с общим азотом [Moiser, Francis, 2010]. Связаны ли стехиометрия биопленок и биогеохимические циклы бактерий, известно немного.

Наши наблюдения показали, что большее количество денитрификаторов приурочено к биопленкам с более высоким стехиометрическим соотношением азота и фосфора. В биопленках на станциях St3 и St4 выявлено 4,0 и  $4,7 \log_{10}$  кл/г денитрификаторов и молярное соотношение азота к фосфору, равное 30 и 21 соответственно. В биопленках станций St1 и St2 3,0 и  $2,5 \log_{10}$  кл/г денитрификаторов и молярное соотношение азота и фосфора 12 и 17 соответственно (рис. 4). Н. Hillebrand и U. Sommer [1999] в экспериментах по культивированию перифитона в разных условиях снабжения неорганическими питательными веществами выявили, что молярное соотношение N : P биомассы, равное 13 и менее, указывало на дефицит азота, а соотношение, равное 22 и более, – на дефицит фосфора. В условиях дефицита азота и фосфора как по отдельности, так и совместно наблюдалось снижение скорости роста перифитонного мата.

Ранее в 2015 г. (за 4 года до настоящего исследования) в районе St1 и St2 Ozersky с соавт. проведены эксперименты с использованием субстратов, рассеивающих различ-

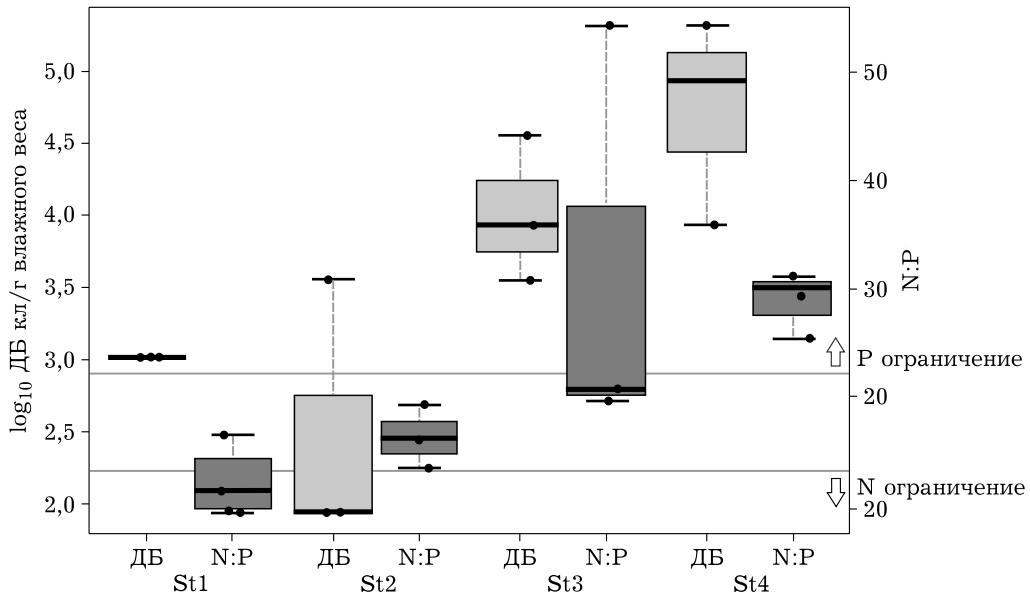


Рис. 4. Распределение денитрифицирующих бактерий (кл/г сырого веса) и стехиометрического соотношения N : P на станциях исследования. Боксплоты охватывают 2-й и 3-й квартили, линия посередине – медиана. Усы – максимальные и минимальные значения

ные концентрации неорганических питательных веществ [Ozersky et al., 2018]. Стимуляция только фосфором не давала значимого прироста фитобентоса, определяемого по хлорофиллу и количеству клеток. Гораздо заметнее рост стимулировал азот, а значительное усиление продукции получено при совместном стимулировании азотом и фосфором. Это говорит о том, что продукция фитобентоса в данном районе ограничена дефицитом азота, а не фосфора. Наши наблюдения стехиометрии азота и фосфора эпилитных биопленок согласуются с полученными ранее, и пять из девяти образцов эпилитона этого района показали дефицит азота согласно классификации, предложенной H. Hillebrand и U. Sommer [1999].

Таким образом, показано, что денитрифицирующие бактерии более распространены в эпилитных биопленках, не испытывающих дефицит азота, определенный по стехиометрии азота и фосфора в биомассе эпилитного сообщества.

#### **Совокупность факторов, определяющих распределение культивируемых гетеротрофных денитрификаторов в эпилитных биопленках озера Байкал**

Многочисленные исследования, посвященные экологии денитрификации, показали, что

этот процесс регулируется комплексом факторов. Наибольшая потенциальная активность денитрификации, определенная методом ацетиленового блока, и концентрация генов денитрификации наблюдаются, когда соблюдаются следующие условия: аноксия, доступность нитратов и органического вещества, а также оптимальная температура [Ventullo, Rowe, 1982; Opdyke, Mark, 2007; Boulêtreau et al., 2012]. Исходя из этого, в эфтрофных водоемах денитрификация протекает активнее [Zhang et al., 2019]. Наиболее часто учитываются такие факторы денитрификации, как содержание азота, кислорода, органического вещества. К более редко учтываемым факторам можно отнести, например, содержание тяжелых металлов [Deng et al., 2018]. Так, установлено, что в осадках концентрация тяжелых металлов отрицательно коррелировала с уровнем транскрипции генов денитрификации [Chen et al., 2020]. Лабораторные инкубационные исследования показали, что добавление металлов Cd, Cu или Zn в количестве до 500 мг/кг каждого значительно снижает денитрификацию в отложениях водно-болотных угодий, при этом наибольшее влияние оказывает Cd, за которым следуют Zn и Cu [Sakadevan et al., 1999]. В данном исследовании концентрация тяжелых металлов в эпилитных биопленках в среднем составила около 70 мг/кг и не

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

показала значимой отрицательной корреляции как самостоятельный предиктор распределения культивируемых денитрификаторов ( $r = -0,4$ ,  $p = 0,63$ ). Также следует учитывать, что общая концентрация тяжелых металлов, как правило, превышает биологически доступную [Zhong et al., 2020]. Все вместе это, по-видимому, объясняет слабое влияние тяжелых металлов эпилитных биопленок оз. Байкал на численность денитрифицирующих бактерий.

Химический состав органических веществ, продуцируемых водорослями, ассоциированными с денитрификаторами в биопленке, также может быть основным фактором, определяющим протекание процесса нитратного дыхания. Так, в двух водотоках с контрастно различающимся уровнем нитратов, эпилитные биопленки не отличались по уровню генов *nirS* и потенциальному денитрификации, но значительно отличались химическим составом растворенных органических веществ, доступных для поглощения бактериями [Reiterson et al., 2011]. Имеется исследование, подтверждающее, что внеклеточные органические вещества диатомовых водорослей лучше других способствуют денитрификации в перифитоне [Ishida et al., 2008]. В данной работе не учитывался химический состав органических веществ, доступных денитрифицирующим бактериям. Однако пробы эпилитона были проанализированы на предмет доступного микробам органического вещества с помощью косвенного метода культивирования на питательных средах. Численность денитрификаторов в биопленке коррелировала с количеством культивируемых гетеротрофных микроорганизмов, учтенных на среде РПА10 на квадратный сантиметр площади камня. Количество культивируемых на РПА10 микроорганизмов также показало тесную положительную связь с содержанием органического вещества как в биопленке, так и в водной толще.

Таким образом, совокупность основных факторов, объясняющих распределение культивируемых денитрификаторов в эпилитоне оз. Байкал, следующая: содержание общего азота и температура в придонном слое воды, соотношение N : P в биопленке.

В эпилитных биопленках литоральной зоны оз. Байкал культивируемые гетеротрофные денитрифицирующие бактерии выявлены в количестве от 6 до  $6 \times 10^4$  кл/см<sup>2</sup>. Численность культивируемых денитрификаторов в эпилитоне статистически значимо различалась на исследуемых станциях. Наибольший потенциал денитрификации наблюдался на станции в проливе Ольхонские Ворота и, вероятно, отражал высокую интенсивность денитрификации в этом районе.

Общий азот в придонной воде, окружающей субстраты с биопленками, температура воды и стехиометрическое соотношение азота и фосфора в биопленках определяли распределение культивируемых денитрификаторов. Выявлена положительная взаимосвязь между этими факторами и денитрификаторами.

Из четырех исследуемых районов литорали оз. Байкал район пос. Листвянка считается самым "экологически неблагополучным", что выражается в массовом развитии не типичного для этого местообитания фитобентоса [Kravtsova et al., 2014]. Избыточное поступление биогенных элементов – общепризнанный фактор наблюдаемого явления. Содержание общего азота и фосфора в придонных водах у пос. Листвянка было на уровне пролива Ольхонские Ворота, однако численность денитрификаторов в эпилитных биопленках была значительно ниже. Как показали наблюдения, частично это может быть связано с ингибированием денитрификации температурой и скоплением таких микроэлементов, как Cr, Zn, Cu, Pb. Кроме того, баланс азота и фосфора в биомассе эпилитона данного района не является оптимальным, а указывает на перевес в сторону фосфора и, следовательно, конкуренцию за азот в консорциуме организмов эпилитной биопленки. Необходимы дальнейшие исследования для лучшего понимания пространственной и сезонной динамики денитрификации в литоральной зоне оз. Байкал и основных регулирующих ее факторах, что позволит сделать прогноз удаления азота при эвтрофикации и температурных изменениях.

Работа выполнена в рамках госбюджетного проекта № 0279-2021-0015, 0279-2021-0014. Выражаем благодарность водолазу к. б. н. И. А. Небесных за

отбор проб, к. б. н. Н. Н. Куликовой за обсуждение. Сканирующая электронная микроскопия выполнена в центре коллективного пользования “Ультрамикроанализ” Лимнологического института СО РАН.

## ЛИТЕРАТУРА

- Воробьева Т. Я., Ершова А. А., Морева О. Ю., Чупаков А. В., Забелина С. А., Климов С. И. Микробиологические и гидрохимические аспекты круговорота азота в озерах Кенозерского национального парка // Вест. Сев. Аркт. фед. ун-та. Естеств. науки. 2012. № 4. С. 13–22.
- Горбенко Ю. А. О наиболее благоприятном количестве сухого питательного агара в средах для культивирования морских микроорганизмов // Микробиология. 1961. Т. 30, № 1. С. 168–172.
- ГОСТ 18309-2014 Вода. Методы определения фосфорсодержащих веществ.
- ГОСТ 33045-2014 Вода. Методы определения азотсодержащих веществ.
- ПНД Ф 14.1:2.4.190-2003 Методика измерения бихроматной окисляемости (химического потребления кислорода) в пробах природной, питьевой и сточной вод фотометрическим методом с применением анализатора жидкости Флюорат-02.
- ПНД Ф 16.1:2.3:3.11-98 Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений содержания металлов в твердых объектах методом спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.
- Подлесная Г. В., Потапов С. А., Краснопеев А. Ю., Штыкова Ю. Р., Томберг И. В., Тимошкин О. А., Белых О. И. Разнообразие денитрифицирующих бактерий в биопленках, сформированных на каменистых субстратах в литоральной зоне озера Байкал // Микробиология. 2020. Т. 89, № 3. С. 367–371 [Podlesnaya G. V., Potapov S. A., Krasnopoev A. Yu., Shtykova Yu. R., Tomberg I. V., Timoshkin O. A., Belykh O. I. Diversity of Denitrifying Bacteria in Biofilms Formed on Stony Substrates of the Lake Baikal Littoral Zone // Microbiology. 2020. Vol. 89, N 3. P. 369–373].
- Подлесная Г. В., Суслова М. Ю., Штыкова Ю. Р., Томберг И. В., Елецкая Е. В., Тимошкин О. А., Белых О. И. Сезонные и пространственные вариации численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в сообществах планктона и эпилитона литорали оз. Байкал // Сиб. экол. журн. 2021. Т. 28, № 5. С. 641–652 [Podlesnaya G. V., Suslova M. Yu., Shtykova Yu. R., Tomberg I. V., Eletskaya E. V., Timoshkin O. A., Belykh O. I. Seasonal and spatial variations in the number of ammonifying and denitrifying bacteria in communities of plankton and epilithon from the littoral zone of Lake Baikal // Contemporary Problems of Ecology. 2021. Vol. 14, N 5. P. 515–524].
- РД 52.24.383 Массовая концентрация аммонийного азота в водах. Методика измерений фотометрическим методом в виде индофенолового синего.
- РД 52.24.532-2016 Массовая концентрация общего азота в водах. Методика измерений спектрофотометрическим методом с минерализацией проб в термопрессоре.
- Родина А. Г. Методы водной микробиологии: практическое руководство. М.; Л.: Наука, 1965. 361 с.
- Романова А. П. К микробиологии озера Байкал. Сезонная динамика численности бактерий и процессов круговорота азота в водной толще и грунтах Южного Байкала: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Иркутск: Лимнологический ин-т, 1961. 22 с.
- Bernal S., Segarra A., Merbt S. N., Martí E. Differences in ammonium oxidizer abundance and N uptake capacity between epilithic and epipsammic biofilms in an urban stream // Freshwater Sci. 2018. Vol. 37, N 1. P. 13–22.
- Boulêtreau S., Salvo E., Lyautey E., Mastrorillo S., Garabetian F. Temperature dependence of denitrification in phototrophic river biofilms // Sci. Total Environment. 2012. Vol. 416. P. 323–328.
- Boyer E. W., Alexander R. B., Parton W. J., Li C., Butterbach-Bahl K., Donner S. D., Skaggs R. W., Grossi S. J. D. Modeling denitrification in terrestrial and aquatic ecosystems at regional scales // Ecol. Applicat. 2006. Vol. 16. P. 2123–2142.
- Chen Q., Fan J., Ming H., Su J., Wang Y., Wang B. Effects of environmental factors on denitrifying bacteria and functional genes in sediments of Bohai Sea, China // Mar. Pollut. Bull. 2020. Vol. 160. P. 111621.
- Deng D., Hu M., Li L., Huang Y. Denitrifying Microbial Communities in Heavy-Metal-Contaminated Paddy Soils near Electronic-Waste Processing Centers // Water Air Soil Pollut. 2018. Vol. 229, N 10. P. Art. N 318.
- Diehl S., Thomsson G., Kahlert M., Guo J., Karlsson J., Liess A. Inverse relationship of epilithic algae and pelagic phosphorus in unproductive lakes: Roles of N<sub>2</sub> fixers and light // Freshwater Biol. 2018. Vol. 63, N 7. P. 662–675.
- Gaimster H., Alston M., Richardson D. J., Gates A. J., Rowley G. Transcriptional and environmental control of bacterial denitrification and N<sub>2</sub>O emissions // FEMS Microbiol. Lett. 2018. Vol. 365, N 5. Art. N fnx277.
- Henriques M., Silva A., Rocha J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method // Commun. Curr. Res. and Educat. Topics and Trends in Appl. Microbiol. 2007. P. 586–593.
- Hillebrand H., Sommer U. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal // Limnol. Oceanogr. 1999. Vol. 44, N 2. P. 440–446.
- Ishida C. K., Arnon S., Peterson C. G., Kelly J. J., Gray K. A. Influence of Algal Community Structure on Denitrification Rates in Periphyton Cultivated on Artificial Substrata // Microb. Ecol. 2008. Vol. 56. P. 140–152.
- Kahlert M., Hasselrot A. T., Hillebrand H., Pettersson K. Spatial and temporal variation in the biomass and nutrient status of epilithic algae in Lake Erken, Sweden // Freshwater Biol. 2002. Vol. 47, N 7. P. 1191–1215.
- Kravtsova L. S., Izhboldina L. A., Khanaev I. V., Pomazkina G. V., Rodionova E. V., Domysheva V. M., Saikirko M. V., Tomberg I. V., Kostornova T. Ya., Kravchenko O. S., Kupchinsky A. B. Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal // J. Great Lakes Res. 2014. Vol. 40, N 2. P. 441–448.
- Lakatos G. Structural Characterization of Periphyton in Kis-Balaton // Protecting System Bericht. 1991. Vol. 77. 147–156.

- Liess A., Drakare S., Kahlert M. Atmospheric nitrogen deposition may intensify phosphorus limitation of shallow epilithic periphyton in unproductive lakes // Freshwater Biol. 2009. Vol. 54. P. 1759–1773.
- Luo G., Xue C., Jiang Q., Xiao Y., Zhang F., Guo S., Shen Q., Ling N. Soil carbon, nitrogen, and phosphorus cycling microbial populations and their resistance to global change depend on soil C: N: P stoichiometry // mSystems. 2020. Vol. 5, N 3. P. 5: e00162-20.
- Lyautey E., Hallin S., Teissier S., Iribar A., Compin A., Philippot L., Garabetian F. Abundance, activity and structure of denitrifier communities in phototrophic river biofilms (River Garonne, France) // Hydrobiologia. 2013. Vol. 716. P. 177–187.
- Magalhães C. M., Joye S. B., Moreira R. M., Wiebe W. J., Bordalo A. A. Effect of salinity and inorganic nitrogen concentrations on nitrification and denitrification rates in intertidal sediments and rocky biofilms of the Douro River estuary, Portugal // Water Res. 2005. Vol. 39, N 9. P. 1783–1994.
- Malone T. C., Newton A. The Globalization of Cultural Eutrophication in the Coastal Ocean: Causes and Consequences // Front. Mar. Sci. 2020. Vol. 7. P. 670.
- Maranger R., Jones S. E., Cotner J. B. Stoichiometry of carbon, nitrogen, and phosphorus through the freshwater pipe // Limnol. Oceanogr. Lett. 2018. Vol. 3. P. 89–101.
- McClain M., Boyer E., Dent C., Gergel S. E., Grimm N. B., Groffman P. M., Hart S. C., Harvey J. W., Johnston C. A., Mayorga E., McDowell W. H., Pinay G. Biogeochemical Hot Spots and Hot Moments at the Interface of Terrestrial and Aquatic Ecosystems // Ecosystems. 2003. Vol. 36. P. 301–312.
- Mosier A. C., Francis C. A. Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary // Environ. Microbiol. Rep. 2010. Vol. 2. P. 667–676.
- Oddyke M. R., Mark B. D. Response of Sediment Denitrification Rates to Environmental Variables in Streams Heavily Impacted by Agriculture // J. Freshwater Ecol. 2007. Vol. 22, N 3. P. 371–382.
- Ozersky T., Volkova E. A., Bondarenko N. A., Timoshkin O. A., Malnik V. V., Domysheva V. M., Hampton S. E. Nutrient limitation of benthic algae in Lake Baikal, Russia // Freshwater Sci. 2018. Vol. 37, N 3. P. 472–482.
- Peterson C. G., Daley A. D., Pechauer S. M., Kalscheur K. N., Sullivan M. J., Kufta S. L., Rojas M., Gray K. A., Kelly J. J. Development of associations between microalgae and denitrifying bacteria in streams of contrasting anthropogenic influence // FEMS Microbiol. Ecol. 2011. Vol. 77. P. 477–492.
- Podlesnaya G. V., Krasnopeev A. Yu., Potapov S. A., Tikhonova I. V., Shtykova Yu. R., Suslova M. Yu., Timoshkin O. A., Belykh O. I. Diversity of nitrifying bacteria in microbial communities from water and epilithic biofilms of the Lake Baikal littoral zone // Limnol. and Freshwater Biol. 2020. Vol. 4. P. 1008–1010.
- Qin P., Mayer C. M., Schulz K. L., Ji X., Ritchie M. E. Ecological stoichiometry in benthic food webs: Effect of light and nutrients on periphyton food quantity and quality in lakes // Limnol. Oceanogr. 2007. Vol. 52. P. 1728–1734.
- Ribot M., Martí E., Schiller D., Sabater F., Daims H., Battin T. J. Nitrogen processing and the role of epilithic biofilms downstream of a wastewater treatment plant // Freshwater Sci. 2012. Vol. 31, N 4. P. 1057–1069.
- Sakadevan K., Zheng H., Bavor H. J. Impact of Heavy Metals on Denitrification in Surface Wetland Sediments Receiving Wastewater // Water Sci. Technol. 1999. Vol. 40, N 3. P. 349–355.
- Sanli K., Bengtsson-Palme J., Nilsson R. H., Kristiansson E., Alm Rosenblad M., Blanck H., Eriksson K. M. Metagenomic sequencing of marine periphyton: taxonomic and functional insights into biofilm communities // Front. Microbiol. 2015. Vol. 6. P. 1192.
- Seitzinger S., Harrison J. A., Böhlke J. K., Bouwman A. F., Lowrance R., Peterson B., Tobias C., Drecht G. V. Denitrification across landscapes and waterscapes: a synthesis // Ecol. Applicat. 2006. Vol. 16. P. 2064–2090.
- Teissier S., Torre M. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method // Water Res. 2002. Vol. 36, N 15. P. 3803–3811.
- Teissier S., Garabetian F., Torre M., Dalger D. Labroue L. Impact of an urban centre on the nitrogen cycle processes of epilithic biofilms during a summer low-water period // River Res. Appl. 2002. Vol. 18. P. 21–30.
- Teissier S., Mathieu T., François D., Frédéric G. Detailing biogeochemical N budgets in riverine epilithic biofilms // J. North Am. Benthological Society. 2007. Vol. 26, N 2. P. 178–190.
- Ventullo R. M., Rowe J. J. Denitrification potential of epilithic communities in a lotic environment // Current Microbiol. 1982. Vol. 7. P. 29–33.
- 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. Vol. 68, N 1. P. 60–69.
- Zhang Y., Song C., Zhou Z., Cao X., Zhou Y. Coupling between Nitrification and Denitrification as well as Its Effect on Phosphorus Release in Sediments of Chinese Shallow Lakes // Water. 2019. Vol. 11, N 9. P. 1809.
- Zhong X., Chen Z., Li Y., Ding K., Liu W., Liu Y., Yuan Y., Zhang M., Baker A. J. M., Yang W., Fei Y., Wang Y., Chao Y., Qiu R. Factors influencing heavy metal availability and risk assessment of soils at typical metal mines in Eastern China // J. Hazardous Materials. 2020. Vol. 400. P. 123289.

# **Ecological factors and denitrifying bacteria of the Baikal lake epilithon**

A. S. GORSHKOVA, G. V. PODLESNAYA, N. A. ZHUCHENKO, I. V. TIKHONOVA,  
M. Yu. SUSLOVA, Yu. R. NEBESNYKH, E. A. ZIMENS, O. I. BELYKH

*Limnological institute SB RAS  
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya, 3  
E-mail: podlesnaya@lin.irk.ru*

Participating in the circulation of nutrients epilithic biofilms play an important role in water bodies. Denitrification actively proceeds in the epilithon of water bodies. However, the information on environmental factors that affect the process in biofilms is still limited. The object of study in this article involves the number of cultivated denitrifying bacteria in biofilms formed on the stony substrates in different parts of Lake Baikal littoral zone. It has been found out that the main factors explaining the differences in the number of cultivated bacteria who perform complete denitrification were the temperature and the concentration of total nitrogen in shallow water. The article shows that lower amount of denitrifiers is a typical for biofilms experiencing nitrogen deficiency as indicated by the low stoichiometric N: P ratio in biofilms. An uneven distribution of heavy metals in the biomass of epilithic biofilms has been determined. It also may potentially impact denitrification in the epilithon of Lake Baikal.

**Key words:** cultivated heterotrophic denitrifying bacteria, epilithon, denitrification factors, ecological stoichiometry.