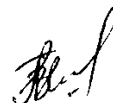


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ЛИН СО РАН)

На правах рукописи



ПОДЛЕСНАЯ Галина Владимировна

**ОСОБЕННОСТИ БАКТЕРИАЛЬНОГО КРУГОВОРОТА АЗОТА В
ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

1.5.16 – гидробиология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Белых Ольга Ивановна

Иркутск, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1. Круговорот азота в природе	8
1.2. Характеристика основных этапов круговорота азота	9
1.2.1. Азотфиксация	9
1.2.2. Нитрификация	11
1.2.3. Денитрификация.....	13
1.2.4. Аммонификация (минерализация азота)	15
1.3. Методы изучения процессов круговорота азота.....	17
1.3.1. Методы изучения азотфиксации	19
1.3.2. Методы изучения нитрификации и анаммокса.....	20
1.3.3. Методы изучения денитрификации	21
1.3.4. Методы изучения аммонификации	21
1.4. Круговорот азота в озерах.....	22
1.4.1. Исследования процессов круговорота азота в водоемах озерного типа.....	25
1.4.2. Исследования процессов круговорота азота на оз. Байкал.....	30
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1. Объекты исследования, отбор проб и подготовка к анализу	36
2.2. Методы исследования.....	38
2.2.1. Микробиологические методы	38
2.2.2. Молекулярно-генетические методы.....	42
2.2.3. Физико-химические методы	48
ГЛАВА 3. ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ КРУГОВОРОТА АЗОТА В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗ. БАЙКАЛ	50
3.1. Сезонно-пространственное изменение численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилимне в июне и сентябре 2017-2019 гг.	50
3.2. Экологические факторы, определяющие пространственное распределение численности денитрифицирующих бактерий эпилимна в августе 2019 г.....	59

ГЛАВА 4. ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ КРУГОВОРОТА АЗОТА В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗ. БАЙКАЛ.....	66
4.1. Культивируемые денитрифицирующие бактерии в эпилитных биопленках	66
4.2. Некультивируемые денитрифицирующие бактерии в эпилитных биопленках, определенные методом клонирования.....	70
4.3. Анализ разнообразия микробных сообществ водной толщи, поверхностного микрослоя воды и эпилитных биопленок по генам 16S рРНК, <i>nirK</i> и <i>nirS</i> методом высокопроизводительного секвенирования.....	76
4.4. Разнообразие нитрифицирующих бактерий в микробных сообществах воды и эпилитных биопленок по данным высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК.....	91
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСТОЧНИКА АЗОТА НА РОСТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Азот является одним из основных биогенных элементов, необходимых для функционирования всего живого. Он входит в состав белков, аминокислот, ДНК и РНК, многих других простых и сложных молекул. Огромные запасы молекулярного азота сосредоточены в атмосфере, до 80% (Camargo, Alonso, 2006). В почвах и водоемах он присутствует в нескольких формах, которые под воздействием различных факторов постоянно переходят друг в друга и находятся в динамической взаимосвязи, описываемой в виде круговорота азота – глобального или частного (Бикбулатов и др., 2007). Биогеохимический круговорот азота представляет собой ключевой механизм формирования качества воды. От концентрации азотсодержащих соединений зависит общая продуктивность водоема (Кузнецов и др., 1985; Wetzel, 2001).

Изучение биологических процессов трансформации азотсодержащих соединений относится к числу важнейших задач гидробиологии, поскольку позволяет приблизиться к пониманию процессов, происходящих в водных экосистемах в целом. Многие работы посвящены изучению круговорота азота в водоемах озерного типа (Саралов, 1979; Кузнецов и др., 1985; Schubert et al., 2006; Chen et al., 2009; Hou et al., 2013; Bollmann et al., 2014; Rathsack et al., 2014; Vila-Costa et al., 2014; Zhao et al., 2015; Fun et al., 2016; Mukherjee et al., 2016; Castellano-Hinojosa et al., 2017; Álvarez-Cobelas et al., 2019; Palacin-Lizarbe et al., 2019). На озере Байкал такие исследования начаты в прошлом столетии и представлены единичными сведениями о количестве некоторых групп бактерий (Родина, 1954; Романова, 1961; Верхозина, 1985), поэтому проведение новых комплексных исследований в изменившихся условиях с использованием современных методов особенно актуально.

Цель работы – изучить сообщество бактерий круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал, используя комплекс микробиологических, молекулярно-генетических и гидрохимических методов.

Задачи:

1. Исследовать сезонные и пространственные вариации численности культивируемых аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилимноне литорали озера Байкал.
2. Охарактеризовать таксономическое разнообразие бактерий, участвующих в превращениях азотсодержащих соединений, в различных биотопах озера Байкал с помощью методов культивирования и секвенирования фрагментов маркерного гена 16S рРНК и функциональных генов *nirK* и *nirS*.
3. Оценить влияние физико-химических факторов на численность и разнообразие бактерий круговорота азота.
4. Экспериментально определить влияние источника азота на рост бактериальных культур.

Научная новизна работы. Определена численность культивируемых аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилимноне литоральной зоны оз. Байкал в районах с различной антропогенной нагрузкой. Выявлены основные экологические факторы, влияющие на распространение исследуемых групп бактерий. С применением молекулярно-генетических методов впервые охарактеризован таксономический состав бактерий круговорота азота в различных биотопах оз. Байкал. С помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показаны морфологические и ультраструктурные особенности выделенных бактериальных культур при переходе к diazotrophic росту.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе исследования получены ценные теоретические данные о таксономическом разнообразии нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий в различных биотопах оз. Байкал. Сформирована коллекция чистых культур денитрифицирующих бактерий, обладающих биотехнологическим потенциалом. Полученные в работе последовательности фрагмента гена *nirK* и массивы данных NGS (гены 16S рРНК, *nirK*, *nirS*) зарегистрированы в базе данных GenBank и могут быть использованы для сравнительного анализа с

последовательностями из других сред обитания. Комплексные данные о численности физиологических групп бактерий круговорота азота и гидрохимических параметрах среды могут быть использованы при проведении мониторинга экосистемы оз. Байкал.

Положения, выносимые на защиту:

1. Численность и пространственное распределение аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в литоральной зоне оз. Байкал связаны с физико-химическими параметрами среды, а именно с температурой, содержанием минеральных и органических форм азота, стехиометрическим соотношением азота и фосфора.
2. Состав денитрифицирующих и нитрифицирующих бактерий в различных биотопах литорали оз. Байкал характеризуется высоким таксономическим и генетическим разнообразием и сходен с таковым в других озерных экосистемах. Разнообразие денитрификаторов представлено классами *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* и *Deltaproteobacteria*, нитрификаторов – классами *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, филами *Nitrospirota* и *Nitrospinota*.

Апробация работы.

Основные результаты исследований представлены на Международной научной конференции «Life Science for Green Technologies» в рамках молодежного форума Байкал (Иркутск, 2017), XIII Международной конференции по исследованию соленых озер (Улан-Удэ, 2017), Международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий», посвященной 100-летию Иркутского государственного университета (Иркутск, 2018), Международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы» (Иркутск, 2018), V Международном Байкальском Микробиологическом Симпозиуме «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2020), III Всероссийской конференции с международным участием «Экология и

геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ – Байкальск, 2023).

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненных согласно планам научно-исследовательской работы, в лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН в рамках базовых проектов. Автор принимал личное участие в экспедиционных и экспериментальных работах, обработке, анализе и обсуждении результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ: 5 статей в рецензируемых изданиях, из них 3 статьи, входящих в список ВАК, 5 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 23 рисунка и 9 таблиц. Список литературы включает 289 источников, из которых 43 отечественных и 246 зарубежных.

Благодарности.

Автор выражает благодарность и искреннюю признательность научному руководителю к.б.н., доценту О.И. Белых и благодарит всех сотрудников лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН за всестороннюю поддержку и помощь в проведении исследований. Автор благодарит д.б.н., проф. О.А. Тимошкина, к.г.н. И.В. Томберг, Н.А. Жученко, Е.В. Елецкую, к.б.н. А.Г. Лухнева, к.б.н. В.В. Мальника, коллектив водолазной группы ЛИН СО РАН, а также сотрудников приборного центра ЛИН СО РАН «Электронная микроскопия», ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск) и ЦКП ИСКЦ СО РАН (кластер «Академик В. М. Матросов») за помощь в проведении работы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Круговорот азота в природе

Азот составляет большую часть атмосферы Земли (78-80%) и является одним из самых распространенных элементов в составе клеток микро- и макроорганизмов (Camargo, Alonso, 2006).

В природе круговорот азота состоит из нескольких этапов, основную роль в которых играют микроорганизмы. На протяжении долгих лет выделяли три основных этапа: азотфиксацию, нитрификацию и денитрификацию. В последнее время в связи с развитием новых методов исследований и накоплением большого объема данных выявлены такие превращения азотсодержащих соединений, как диссимиляционное восстановление нитрата в аммоний и анаэробное окисление аммония (анаммокс) (Stein, Klotz, 2016).

Таким образом, в настоящее время принято считать, что круговорот азота состоит из следующих этапов (рис. 1): азотфиксация (реакция 1); ассимиляционное и диссимиляционное восстановление нитрата до аммония (реакции 5, 2); нитрификация (реакции 3А, 3В, 4); денитрификация (реакции 5, 6А-Д); анаммокс (7А-С); минерализация органического вещества – аммонификация; ассимиляция аммония живыми организмами (Stein, Klotz, 2016).

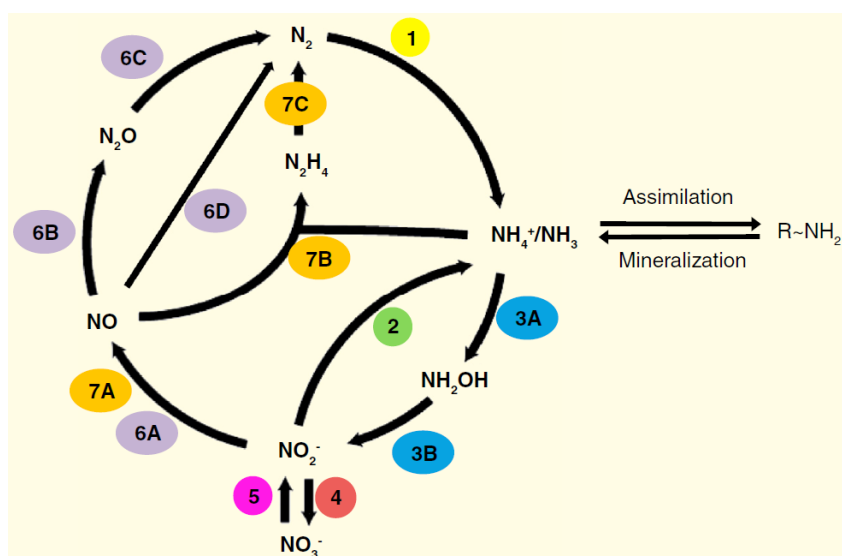


Рисунок 1 – Процессы, составляющие круговорот азота в природе (Stein, Klotz, 2016)

Основными направлениями исследований круговорота азота являются определение разнообразия участвующих в нем функциональных групп микроорганизмов и оценка влияния факторов окружающей среды на структуру микробных сообществ и скорости процессов (Reed et al., 2011; Imhoff, 2016).

1.2. Характеристика основных этапов круговорота азота

1.2.1. Азотфиксация

Азотфиксация – процесс, посредством которого молекулярный азот восстанавливается до аммиака. Благодаря азотфиксации был создан и ныне поддерживается азотный статус всех наземных и водных экосистем (Zehr et al., 2003; Умаров и др., 2007).

Согласно современным представлениям, процесс биологической азотфиксации отображается следующим уравнением (Умаров и др., 2007; Franche et al., 2009).



Как видно, процесс фиксации молекулярного азота связан с затратами большого количества энергии. Источниками протонов, электронов и АТФ служат процессы брожения (у анаэробных азотфиксаторов), дыхания (у аэробных азотфиксаторов) и фотосинтеза (у цианобактерий, пурпурных и зеленых серных бактерий) (Емцев, Мишустин, 2005).

Образовавшийся аммиак связывается кетокислотами, что приводит к синтезу различных аминокислот. Так, из 2-оксоглутарата и аммиака получается глутаминовая кислота. Глутаминовая кислота с затратой энергии в виде АТФ превращается в глутамин, а из него синтезируется важнейший метаболит – аспарагин. В дальнейшем аминокислоты идут на синтез белков и других азотсодержащих органических соединений (Емцев, Мишустин, 2005).

Восстановление молекулярного азота в аммиак катализируется ферментным комплексом нитрогеназа. Среди известных четырех различных типов нитрогеназ наиболее подробно изучены строение и свойства

молибдензависимой. Мо-нитрогеназа представляет собой комплекс из двух металлопротеинов: молибдоферредоксина (Мо-Fe-белок) и редуктазного компонента (Fe-белок). Три альтернативные нитрогеназы (ванадий-содержащая, железо-содержащая и супероксидзависимая) синтезируются в условиях дефицита молибдена в среде (Raymond et al., 2004; Умаров и др., 2007). Синтез нитрогеназы кодируется *nif* генами. Полный комплект нитрогеназы требует нескольких *nif* генов, включая *nifD* и *nifK* для Мо-протеиновых субъединиц и *nifH* для Fe-протеина, а также ряд других генов (*nifB*, *nifQ*, *nifE*, *nifN*, *nifU*, *nifS*, *nifY*, *nifW*, *nifZ*) (Умаров и др., 2007; Franche et al., 2009). Основными факторами, регулирующими активность фермента, являются кислород, доступность источника энергии (АТФ), металлов (Мо, Fe, V) и наличие внешних источников азота (NH_4^+ , NO_3^-) (Reed et al., 2011). Нитрогеназа очень чувствительна к действию молекулярного кислорода. Кислород не только ингибирует процесс азотфиксации, но может препятствовать синтезу самого фермента. У цианобактерий усвоение молекулярного азота происходит в специализированных клетках с толстой клеточной стенкой – гетероцистах, куда ограничен доступ кислорода (представители родов *Nostoc*, *Dolichospermum*, *Anabaena*, *Cylindrospermum*, *Tolypothrix* и др.). В последнее время найдены негетероцистные азотфиксирующие цианобактерии – представители родов *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Oscillatoria* и др. (Емцев, Мишустин, 2005). У свободноживущих азотфиксаторов существуют уникальные биохимические и морфологические механизмы, защищающие нитрогеназу от кислорода. Так, механизм дыхательной защиты *Azotobacter vinelandii* состоит из двух процессов: увеличения скорости дыхания и уменьшения скорости диффузии кислорода в клетку путем образования полисахаридной капсулы (Берцова и др., 2005).

К настоящему времени способность к фиксации молекулярного азота обнаружена у представителей большинства физиологических и таксономических групп бактерий и архей (Young, 1992; Raymond et al., 2004;

Умаров и др., 2007). Азотфиксаторы могут быть автотрофами, гетеротрофами, хемолитотрофами, фотогетеротрофами и метаногенами, по отношению к кислороду – строгими анаэробами, факультативными анаэробами или облигатными аэробами (Reed et al., 2011).

1.2.2. Нитрификация

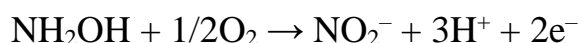
Нитрификация – микробное окисление аммония до нитрата через нитрит. Процесс имеет фундаментальное значение во всех экосистемах, поскольку обеспечивает связь между восстановительными и окислительными сторонами азотного цикла (Herbert, 1999).

Первая фаза нитрификации – трансформация аммония в нитрит, состоит из двух этапов. На первом этапе фактическим субстратом является аммиак (NH_3), а не ион аммония (NH_4^+) (Suzuki et al., 1974), и аммиак окисляется до гидроксилamina с помощью мембраносвязанного мультисубъединичного фермента медьсодержащая аммиакмонооксигеназа (АМО), кодируемого генами *amoCAB*:



Ген *amoA*, кодирующий альфа-субъединицу аммиакмонооксигеназы, наиболее часто используется в качестве функционального маркера для анализа распределения и разнообразия аммонийоокисляющих прокариот (Alfreider et al., 2018).

Затем гидроксилamin окисляется до нитрита с помощью периплазматического фермента гидроксилamin-оксидоредуктаза (НАО), кодируемого генами *hao* (Hirota et al., 2006):



Вторая фаза – окисление нитрита до нитрата катализируется мембраносвязанной нитрит-оксидоредуктазой (NXR), кодируемой генами *nxrABC* (Ge et al., 2015; Chicano et al., 2021):



Окисление аммония до нитрита выполняют хемолитоавтотрофные аммонийоокисляющие бактерии (АОБ) и археи (АОА). Филогенетическое разнообразие АОБ на сегодняшний день представлено родами *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio* (*Betaproteobacteria*) и *Nitrosococcus* (*Gammaproteobacteria*) (Koops et al., 2006). Все известные АОА являются представителями филума *Thaumarchaeota* (Taylor, Kurtz, 2020). В последнее время большое внимание уделяется вопросу, в каких условиях доминирует окисление аммиака АОА, а в каких АОБ. Как правило, АОБ преобладают в небольших озерах в условиях с высокими концентрациями аммиака, тогда как АОА в глубоких олиготрофных озерах, гипolimнион которых насыщен кислородом (Jiang et al., 2020).

Окисление нитрита до нитрата выполняют хемолитоавтотрофные нитритоокисляющие бактерии (НОБ). Недавние исследования привели к открытию фотолитоавтотрофных НОБ, использующих нитрит в качестве донора электронов для аноксигенного фотосинтеза (Griffin et al., 2007). Филогенетическое разнообразие НОБ на сегодняшний день представлено родами *Nitrobacter* (*Alphaproteobacteria*), *Nitrococcus* (*Gammaproteobacteria*), *Nitrospina* (*Nitrospinae*), *Nitrospira* (*Nitrospirae*), *Nitrotoga* (*Betaproteobacteria*), *Nitrolancea* (*Chloroflexi*) и *Candidatus Nitromaritima* (*Nitrospinae*) (Daims et al., 2016).

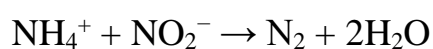
На протяжении многих десятилетий существовало убеждение, что окисление аммония и окисление нитрита осуществляется принципиально разными группами микроорганизмов. В последние годы обнаружены нитрификаторы в роде *Nitrospira*, способные проводить полное окисление аммония до нитрата – «комаммокс» (Daims et al., 2015; van Kessel et al., 2015).

Нитрификаторы встречаются повсеместно: в почвах, пресноводных и морских экосистемах, в ассоциации с морскими губками, экстремальных местах обитания и др. (Arrigo et al., 1995; Diaz, Ward, 1997; Carini, Joye, 2008).

Многие гетеротрофные микроорганизмы также способны окислять соединения азота. Процесс окисления аммиака, гидроксилamina и

азотсодержащих органических веществ до нитрита и нитрата хемоорганотрофными микроорганизмами называется гетеротрофной нитрификацией. Для гетеротрофов процесс не является энергодающим и не связан непосредственно с клеточным ростом, вследствие чего нитрифицирующая активность у них значительно ниже, чем у автотрофных нитрификаторов (Умаров и др., 2007).

В 1990-х гг. в системе очистки сточных вод обнаружен процесс анаэробного окисления аммония (анаммокс), в ходе которого ион аммония и нитрит-ион превращаются в молекулярный азот (van de Graaf et al., 1995):

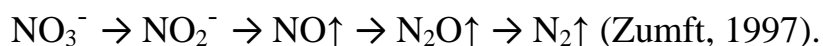


Бактерии, осуществляющие анаммокс, принадлежат порядку *Planctomycetes* и содержат в клетке специализированную структуру – анаммоксосому, защищающую цитоплазму от токсичных промежуточных соединений, таких как гидразин (Jetten et al. 2003; Strous et al. 2006). На данный момент идентифицировано всего пять родов анаммокс – бактерий (Jetten et al., 2009). Показано, что анаммокс происходит в различных природных местообитаниях (аноксичные сточные воды, обедненные кислородом зоны океана, донные отложения умеренного шельфа, морской лед, горячие источники и др.) (Jetten et al., 1998; Rysgaard, Glud 2004; Jaeschke et al. 2009; Mardanov et al., 2019).

1.2.3. Денитрификация

Денитрификация – форма анаэробного дыхания, при котором нитраты, нитриты и оксиды азота выступают акцепторами электронов и последовательно восстанавливаются до газообразного азота (N_2) (Knowles, 1982; Zumft, 1997). За несколькими исключениями, денитрификаторы предпочитают использовать кислород в качестве терминального акцептора электронов, однако, если концентрация кислорода в среде слишком мала или он полностью отсутствует, продолжают дыхание с использованием альтернативного акцептора (Shapleigh, 2006).

Данный процесс состоит из четырех отдельных реакций:



Эти реакции выполняют нитрат-, нитрит-, NO- и N₂O-редуктазы, кодируемые генами *narG/narA*, *nirK/nirS*, *norB/norC* и *nosZ*, соответственно (Zumft, 1997; Castellano-Hinojosa et al., 2017).

На первом этапе восстановление нитрата в нитрит катализируется либо цитоплазматической нитратредуктазой, кодируемой геном *narG*, либо периплазматической нитратредуктазой, кодируемой геном *narA* (Richardson et al., 2007). Организмы, содержащие вышеназванные гены, не обязательно являются денитрификаторами, а образующийся в этой реакции нитрит может быть использован в других этапах цикла азота, например, в анаэробном окислении аммония и диссимиляционном восстановлении нитрата до аммония (Stein, Klotz, 2016).

Второй этап – восстановление нитрита до монооксида азота катализируется двумя структурно различными, но функционально эквивалентными периплазматическими нитритредуктазами, это медьсодержащая и цитохром *cd1*-содержащая редуктазы. Медьсодержащий фермент кодируется геном *nirK*, гемсодержащий – геном *nirS* (Zumft, 1997). Нитритредуктаза является ключевым ферментом процесса, так как на данном этапе образуется первый газообразный продукт (NO), который потенциально может быть выделен в атмосферу. Однако, чрезмерное накопление NO в клетке недопустимо из-за его токсичности и большинство микроорганизмов, продуцирующих монооксид азота, также способны восстанавливать его до закиси азота (Zumft, 1997; Graf et al., 2014).

Данная реакция представляет собой третий этап денитрификации, катализируемый двумя вариантами (сNOR, qNOR) интегрального мембранного белка (Zumft, 1994; Shiro et al., 2012). Способностью восстанавливать монооксид азота в закись азота зачастую обладают не денитрифицирующие микроорганизмы, это свойство используется для его

детоксикации (Philippot, 2005; Shiro et al., 2012). В денитрифицирующих микроорганизмах респираторную NO-редуктазу кодируют гены *norB* и *norC* (Zumft, 2005; Shiro et al., 2012).

На последнем этапе денитрификации парниковый газ N_2O восстанавливается до молекулярного азота (N_2). Процесс катализируется периплазматическим ферментом N_2O -редуктаза, кодируемым геном *nosZ* (Zumft, Kroneck, 2007). Микроорганизмы, осуществляющие данный этап, особенно важны, ведь увеличение концентрации N_2O в атмосфере способствует глобальному потеплению и разрушению озонового слоя.

Денитрификация – модульный путь. Денитрифицирующие микроорганизмы не всегда включают полный набор генов, кодирующих ферменты, они могут выполнять некоторые этапы процесса (Zumft, 1997). Известны бактерии, осуществляющие только последний шаг денитрификации – восстановление N_2O до N_2 (Simon et al., 2004; Zumft, Kroneck, 2007) и бактерии, конечным продуктом которых является N_2O (Jones et al., 2006). От общей численности микробного сообщества, денитрифицирующие микроорганизмы, как правило, составляют малую часть, тем не менее, они играют важную роль в функционировании экосистем, возвращая молекулярный азот в окружающую среду и замыкая круговорот азота (Henry et al., 2006).

Способность к денитрификации обнаружена у огромного количества разнообразных микроорганизмов (Graf et al., 2014). Большинство денитрифицирующих бактерий являются факультативными аэробными гетеротрофами, в основном принадлежащими классам *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma**proteobacteria* (Zumft, 1997).

1.2.4. Аммонификация (минерализация азота)

При разложении микроорганизмами белков и других азотсодержащих соединений азот освобождается в виде аммиака. Указанный процесс называют аммонификацией или минерализацией азота (Емцев, Мишустин, 2005).

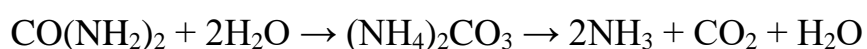
Роль аммонификаторов в природе значительна, поскольку доля белка в тканях умерших растений и животных велика (Нетрусов, 2005). В водоемах минерализация белков протекает как в аэробных, так и в анаэробных условиях (Arnosri et al., 2014).

Разложение белков. Молекулы белков и большинства пептидов велики и не могут проходить через цитоплазматическую мембрану микроорганизмов, поэтому они расщепляются экзоферментами. Протеолитические ферменты, или протеазы, выделяемые клетками микроорганизмов в окружающую среду, осуществляют гидролиз ряда пептидных связей в молекулах белков. Образующиеся при этом частицы белковой молекулы (полипептиды и олигопептиды) поступают внутрь клеток микроорганизмов, где разрушаются внутриклеточными протеолитическими ферментами – пептидазами до свободных аминокислот. Последние используются для синтеза белков клетки или подвергаются дальнейшему расщеплению (Емцев, Мишустин, 2005; Liu et al., 2017). При аэробном распаде белка основными конечными продуктами процесса являются CO_2 , аммиак, сульфаты и вода. В анаэробных условиях образуются аммиак, амины, CO_2 , органические кислоты, меркаптаны, а также индол, скатол и сероводород (Теппер, Шильникова, 2004; Емцев, Мишустин, 2005).

Разложение нуклеиновых кислот. РНК и ДНК – органические вещества большой молекулярной массы, представляющие собой полимеры. При их гидролизе освобождаются пуриновые и пиримидиновые соединения, сахар и фосфорная кислота. Длинные молекулы нуклеиновых кислот при разложении деполимеризуются. Сначала отщепляются небольшие фрагменты, которые затем распадаются на отдельные мононуклеотиды. Процесс расщепления идет при участии ферментов рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, синтезируемых некоторыми видами грибов, актиномицетами и рядом бактерий. На следующем этапе от мононуклеотидов под воздействием нуклеотидаз отщепляется фосфорная кислота, затем – сахар (рибоза или дезоксирибоза), пуриновые и пиримидиновые основания. В зависимости от

типа обмена веществ микроорганизмов сахар в дальнейшем может окисляться кислородом до CO_2 и H_2O или подвергаться брожению с образованием органических кислот и спиртов. Азотсодержащие основания разлагаются до мочевины и аминокислот и, в конце концов, до аммиака и органических кислот (Емцев, Мишустин, 2005).

Разложение мочевины. К азотсодержащим органическим соединениям, часто встречающимся в природе, относятся мочевина, мочева и гиппуровая кислоты. Под действием микроорганизмов, содержащих фермент уреазу, мочевина в несколько этапов превращается в аммиак и диоксид углерода:



Обычно бактерии, разлагающие мочевину, называют уробактериями. Эти организмы могут развиваться при высокой щелочности среды (рН 9 – 10), что позволяет им вызывать распад значительного количества мочевины до аммиака. Физиологический смысл распада мочевины – перевод аминной формы азота в более легкоусвояемую аммиачную (Moblely et al., 1995; Емцев, Мишустин, 2005).

Процесс аммонификации не видоспецифичен и осуществляется бактериями, грибами и некоторыми археями. Особенно активны представители семейства *Pseudomonadaceae* (род *Pseudomonas*), семейства *Bacillaceae* (род *Bacillus*) семейства *Clostridiaceae* (род *Clostridium*), семейства *Enterobacteriaceae* (род *Proteus*) и др. (Нетрусов, 2005; Емцев, Мишустин, 2005). Из специфических уробактерий наиболее важны: *Micrococcus urea*, *Bacillus pasteurii*, *Sporosarcina urea* (Емцев, Мишустин, 2005).

1.3. Методы изучения процессов круговорота азота

Для лучшего понимания процессов круговорота азота важно изучать численность, разнообразие и активность микроорганизмов их осуществляющих.

В микробиологии обычно определяют наличие определенных физиологических групп бактерий и их активность. На протяжении многих

десятилетий и до настоящего времени для количественного определения функциональных групп бактерий круговорота азота применяют метод элективных сред С.Н. Виноградского (Виноградский, 1897; 1952). О наличии бактерий той или иной группы судят по росту их в определенных, наиболее благоприятных для развития средах, по вызываемым ими химическим изменениям. Численность бактерий определяется путем посевов отмеренных количеств проб в твердые (чашечный метод Коха) или жидкие (метод предельных разведений) элективные среды (Родина, 1965). Основанные на культивировании методы имеют ряд недостатков. Они являются достаточно трудоемкими (Both et al., 1990; Philippot, 2006) и неточными, так как выявляют лишь небольшую часть представляющей интерес бактериальной группы в связи с отсутствием подходящих питательных сред, условий культивирования и т.д. (Smith et al., 1992; Amann et al., 1995; Bartscht, 1999; Böllmann et al., 2020).

С развитием молекулярно-биологических методов и разработкой специфичных праймеров стало возможным более точное обнаружение и идентификация бактерий круговорота азота (Zehr et al., 1989; Smith et al., 1992; Rotthauwe et al., 1997; Scala, Braker et al., 1998; Kerkhof, 1998; Throbäck et al., 2004). Тем не менее, молекулярные методы также имеют ряд недостатков (von Wintzingerode et al., 1997; Freeman et al., 1999; Ginzinger, 2002; Smith et al., 2006; Schulz et al., 2010). Основным является то, что данными методами вряд ли возможно увидеть отличия между мертвыми клетками, жизнеспособными, но не активными клетками (VBNC – viable but non-culturable) и метаболически активными клетками (Böllmann et al., 2020).

На данный момент многие работы посвящены сравнению результатов определения численности микроорганизмов, полученных методами культивирования и молекулярно-биологическими методами. Некоторые исследователи обнаружили сопоставимые результаты (Chen et al., 2009; Kayashima et al., 2013), другие сообщают о том, что значения численности, полученные методами культивирования, ниже на несколько порядков (Phillips et al., 2000; Ryuda et al., 2010; Rathsack et al., 2014). Так, в исследовании

денитрифицирующих бактерий в воде оз. Шармютцель методами наиболее вероятного числа (НВЧ) и количественной ПЦР (кПЦР) выявлено, что их количество, обнаруженное культивированием, на три порядка ниже (Rathsack et al., 2014). Авторы предполагают, что данные различия могут быть обусловлены тем, что часть бактерий в естественной среде обитания существует в состоянии покоя (VBNC), вызванного неблагоприятными условиями. Как правило, эти бактерии непригодны для культивирования и показывают очень низкую метаболическую активность, но при подходящих условиях могут снова стать культивируемыми (Oliver, 2005; Fakruddin et al., 2013; Rathsack et al., 2014).

1.3.1. Методы изучения азотфиксации

Впервые существование азотфиксации в пресных водах было выявлено с использованием радиоизотопного метода (Dugdale et al., 1959). С разработкой в 1966 году чувствительного и простого ацетиленового метода для измерения нитрогеназной активности (Stewart et al., 1967; Hardy et al. 1968), скорость азотфиксации была определена в разнообразных водных экосистемах (Саралов, 1979; Goldman, 1972; Mague, Burris, 1973; Hanson, 1977; Horne, Tison et al., 1977; Flett et al., 1980; Ashton, 1981; Horne, Galat, 1985; Levine, Lewis, 1987). Метод основан на том, что азотфиксирующий ферментный комплекс микроорганизмов, восстанавливающий молекулярный азот до аммиака, восстанавливает и ацетилен до этилена. По количеству образовавшегося этилена можно оценить, какое количество азота фиксируется микроорганизмами (Саралов, 1979).

Для изучения азотфиксации также активно применяют молекулярные методы с маркерами к генам нитрогеназы, такие как клонирование ПЦР-продуктов, денатурирующий градиентный гель-электрофорез, полиморфизм длин рестриционных фрагментов и др. (Poly et al., 2001). Исследуя экологию и эволюцию азотфиксирующих бактерий, в качестве биомаркера чаще всего используют консервативный ген *nifH* (Zehr, McReynolds, 1989; Raymond et al.,

2004; Gaby, Buckley, 2014; Angel et al., 2018). Первая пара вырожденных праймеров к этому гену была предложена в 1989 г. (Zehr, McReynolds, 1989). В дальнейшем были разработаны другие праймеры, в том числе групп-специфичные (Gabu, Buckley; 2012). География изученных экосистем очень широка, это почвы, озера, реки, океаны и др. (Zehr et al., 1998; Olson et al., 1999; Zani et al., 2000; Steward et al., 2004; Bird et al., 2005; Short, Zehr, 2005; Steppe, Paerl, 2005).

1.3.2. Методы изучения нитрификации и анаммокса

Поскольку нитрификаторы, как правило, не поддаются культивированию, либо являются трудно культивируемыми, для обнаружения и количественного определения этих организмов большинство исследователей применяют молекулярные методы. Широко используемыми подходами для обнаружения нитрификаторов являются секвенирование 16S рРНК и флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) (Pester et al., 2014). В качестве молекулярных маркеров используют функциональный ген *amoA*, кодирующий субъединицу А аммониймонооксигеназы, присутствующую во всех известных АОБ и АОА (Rotthauwe et al., 1997; Purkhold et al., 2000; Francis et al., 2005) и функциональный ген *nxrB*, кодирующий субъединицу В нитрит оксидоредуктазы в НОБ (Pester et al., 2014). В последние годы разработаны специфичные праймеры к гену *amoA*, позволяющие детектировать бактерии рода *Nitrospira*, способные проводить полное окисление аммония до нитрата. На основании анализа гена 16S рРНК или гена *nxrB* невозможно определить, являются ли бактерии рода *Nitrospira* окислителями аммония до нитрата или же строгими НОБ (Pjevac et al., 2017).

Оценку распространения бактерий, осуществляющих анаэробное окисление аммония, проводят с помощью маркеров к гену 16S рРНК (Hong et al., 2011; Wang et al., 2014), а также к функциональным генам, кодирующим синтез (*hzs*) и окисление (*hzo*) гидразина (Strous et al., 2006).

1.3.3. Методы изучения денитрификации

Для изучения денитрификации в водоемах применяют радиоизотопный метод, основанный на внесении в исследуемый образец $^{15}\text{NO}_3^-$ с дальнейшим определением количества образовавшихся $^{15}\text{N}_2\text{O}$ и $^{15}\text{N}_2$ (Кузнецов и др., 1985). С использованием ацетилена в качестве специфического ингибитора N_2O -редуктазы разработан газохроматографический метод определения скорости денитрификации (Yoshinari, Knowles, 1976). С помощью разных методов показано, что скорость денитрификации в озерных отложениях существенно варьирует, а наибольшая активность наблюдается в местах, подверженных антропогенной нагрузке (Jones, Simon, 1981; Tiren et al., 1976).

Исследуя генетическое разнообразие денитрифицирующих бактерий, применяют функциональные зонды (Smith et al., 1992; Ward, 1995) и праймеры на основе генов, кодирующих основные ферменты процесса (Braker et al., 1998; Scala, Kerkhof, 1998; Hallin, Lindgren, 1999; Philippot, 2002; Braker, Tiedje, 2003; Throbäck et al., 2004). Изучение данной функциональной группы таким методом как традиционное секвенирование 16S рРНК затруднено, поскольку таксономия организмов не связана с их способностью денитрифицировать (Jones et al., 2008).

Недавние исследования, позволяющие детектировать функциональные гены *nirK* и *nirS*, внесли значимый вклад в понимание структуры и разнообразия сообществ денитрифицирующих бактерий в различных биотопах, включая почвы (Throbäck et al., 2004), водную толщу и донные отложения (Braker et al., 2000; Kim et al., 2011; Li et al., 2014), прибрежные микробные маты (Fan et al., 2015), эпилитные биопленки (Vila-Costa et al., 2014), сточные воды (Yoshie et al., 2004).

1.3.4. Методы изучения аммонификации

Интенсивность аммонификации в водоемах определяют радиоизотопным методом (включение метки ^{14}C в органическое вещество и выделение $^{14}\text{CO}_2$) (Mitamura, Saijo, 1980). Метод культивирования (глубинный

посев в чашки Петри, метод титров и др.) традиционно применяют для количественного учета и анализа разнообразия бактерий, минерализующих азотсодержащие органические соединения. Для этой группы микроорганизмов предложен ряд сред, отличающихся высокой селективностью, однако для преемственности в исследованиях обычно используют мясо-пептонный агар, рыбо-пептонный агар, пептонную воду (Родина, 1965).

В качестве молекулярных маркеров наиболее часто применяют функциональный ген *ureC*, кодирующий субъединицу уреазы. Микроорганизмы, гидролизующие мочевину, идентифицированы в микробиомах различных экосистем, таких как почвы, океаны, эстуарии и др. (Collier et al., 2009; Ouyang, Norton, 2020).

1.4. Круговорот азота в озерах

Большой вклад в изучение биогеохимического круговорота азота в водоёмах озерного типа внесли исследования Р. Ветцеля и С. И. Кузнецова. Базируясь на работах этих ученых, можно представить обобщенную схему потоков азота для некоего озера (рис. 2). Эта схема дает хорошее представление о сложности путей и наиболее общих особенностях трансформации азотсодержащих соединений. В общем, если исключить из рассмотрения процессы пополнения и убыли соединений азота за счет притока с водосборной площади и с осадками и выноса с речным стоком и в атмосферу, то все остальные превращения практически связаны с деятельностью микроорганизмов и водорослей (Кузнецов и др., 1985; Бикбулатов и др., 2007).

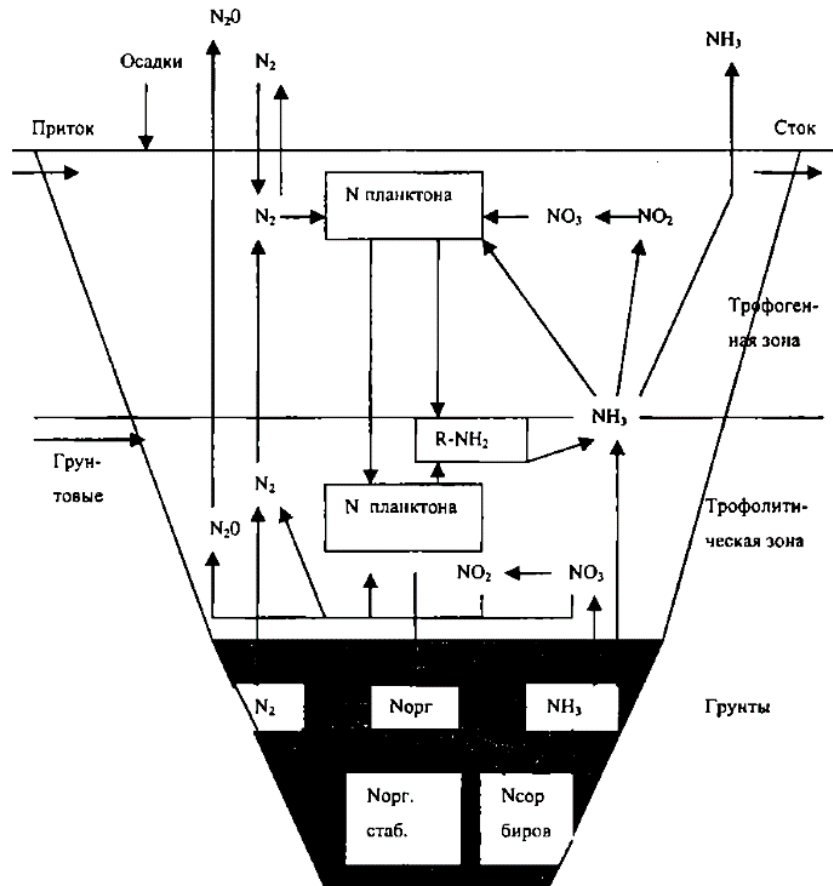


Рисунок 2 – Схема круговорота азота в озерах (Бикбулатов и др., 2007)

Азот является одним из ключевых биогенов, влияющих на продуктивность водоемов. Основные его формы в пресных водах включают растворенный молекулярный азот (N_2), ион аммония (NH_4^+), нитрит (NO_2^-), нитрат (NO_3^-) и большое количество органических соединений (аминокислоты, амины, нуклеотиды, белки и гуминовые соединения). Содержание молекулярного азота в воде димиктических озер в периоды перемешивания обычно находится в равновесии с атмосферой. В периоды стратификации в продуктивных озерах концентрация N_2 может уменьшаться в эпилимнионе из-за снижения растворимости при повышении температуры и увеличиваться в гиполимнионе в результате денитрификации (Wetzel, 2001).

Микробную фиксацию молекулярного азота в озерах и водотоках осуществляют гетеротрофные бактерии и некоторые цианобактерии. Выявлено, что основная роль в проведении этого процесса в озерах принадлежит цианобактериям. Созданный организмами богатый энергией

аммиак в своей основной массе прямо ассимилируется клеткой и идет на построение аминокислот, ДНК и РНК. Отмершие организмы немедленно подвергаются минерализации. В результате разложения белков и других азотсодержащих органических соединений гетеротрофными бактериями образуется аммиак, который присутствует в воде в основном в виде иона аммония в малых концентрациях, так как легко усваивается растениями в фотической зоне, а также окисляется в процессе бактериальной нитрификации через нитрит в нитрат. Нитрит легко окисляется и редко накапливается. Нитрат поступает в озера не только в процессе бактериальной нитрификации, но и с атмосферными осадками, поверхностными и грунтовыми водами. Образующийся нитрат ассимилируется организмами, а также восстанавливается в процессе микробной денитрификации до газообразных форм азота (N_2O , N_2) (Wetzel, 2001; Бикбулатов и др., 2007).

С каждым годом увеличивается количество доступного азота, в основном за счет промышленного производства азотных удобрений (Schlesinger, 2009). Чрезмерное поступление неорганического азота (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) в озера вызывает ряд экологических проблем:

- подкисление пресной воды за счет увеличения концентрации ионов водорода (выбросы газообразных оксидов азота в атмосферу и дальнейшее поступление HNO_3 с осадками в водоемы);

- эвтрофирование (стимуляция роста первичных продуцентов, массовое развитие которых прямо или косвенно вызывает неблагоприятные последствия);

- увеличение концентрации соединений азота до токсического уровня, при котором ухудшается жизнеспособность водных организмов (Camargo, Alonso, 2006).

1.4.1. Исследования процессов круговорота азота в водоемах озерного типа

В настоящее время многие исследования посвящены изучению круговорота азота в озерах. Анализ публикаций отечественных и зарубежных авторов показывает, что большая часть работ проведена с применением комплексного методического подхода, включающего традиционное культивирование, молекулярно-биологические, гидрохимические и др. методы (Chen et al., 2009; Rathsack et al., 2014; Zhao et al., 2015; Castellano-Ninojosa et al., 2017).

Распространение азотфиксирующих бактерий в водной толще и донных отложениях озёр разных типов было исследовано А. И. Сараловым с соавторами. В результате установлено, что важнейшими экологическими факторами, влияющими на качественный состав, распределение и активность азотфиксирующей микрофлоры, являются: температурная и химическая стратификация, глубина проникновения света, активная кислотность воды, содержание растворенного кислорода и продуктов анаэробного распада, поступающих из донных отложений, а также трофические связи между популяциями микроорганизмов соприкасающихся экологических ниш (Саралов, 1979).

В исследовании нитрификаторов (АОБ и АOA) озер Тайху и Чаоху (Китай) показано, что их численность и разнообразие изменяется в зависимости от трофического статуса водоемов. Количество АOA в мезотрофных участках озер было выше, чем в эвтрофных, напротив, количество АОБ возрастало с увеличением трофности. Разнообразие АОБ также было выше в эвтрофных участках и положительно коррелировало со скоростью нитрификации (Hou et al., 2013). В исследовании денитрифицирующих бактерий в эпифитоне и бактериопланктоне оз. Тайху показано, что бактерии, содержащие гены *nirK* или *nirS*, занимают разные ниши. Выявлено, что количество копий гена *nirK* в бактериопланктоне выше, чем в эпифитоне, в то время как для гена *nirS* наблюдали обратную картину.

В целом, для эпифитона и бактериопланктона показана более высокая численность бактерий *nirS*-типа (Fun et al., 2016).

В результате изучения разнообразия денитрифицирующих бактерий в водной толще озера Кинерет (Израиль) установлено, что *nirK*- и *nirS*-содержащие бактерии предпочитают развиваться в разных экологических нишах. Наибольшее разнообразие по гену *nirS* выявлено в эпилимнионе на глубине 1 м, по гену *nirK* – в гиполимнионе на глубине 22 м (Junier et al. 2008).

Методами культивирования и молекулярными методами (детекция гена *amoA*) определены численность и разнообразие АОБ в осадках эвтрофных и олиготрофных бассейнов озера Донху (Китай). Выявлено, что количество АОБ в олиготрофной части озера было значительно ниже, чем в эвтрофной. Генетический анализ показал, что аммонийоокисляющие бактерии *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrosomonas ureae* и *Nitrosospira* встречались повсеместно. При этом бактерии рода *Nitrosomonas* доминировали в эвтрофном бассейне (87,2%), а *Nitrosospira* – в олиготрофном (65,5%). АОБ *Nitrosomonas communis* обнаружены в небольшом количестве (3,2%) только в эвтрофном бассейне озера. Полученные результаты указывают на значительное влияние трофического статуса на численность и разнообразие АОБ (Chen et al., 2009). В более поздних исследованиях сообществ нитрификаторов (по гену *amoA*) и денитрификаторов (по генам *nirK* и *nirS*) в отложениях оз. Донху показано, что среди нитрификаторов преобладали аммонийоокисляющие археи, среди денитрификаторов – бактерии, содержащие ген *nirK* (Hou et al., 2013).

Изучение нитрификаторов (АОБ и АОА) в Великих озерах (олиготрофное оз. Верхнее и мезо-эвтрофное оз. Эри) выявило, что численность и разнообразие также зависят от продуктивности водоема. Так, в осадках и гиполимнионе оз. Верхнее количество копий гена *amoA* АОБ на порядки ниже АОА, в оз. Эри наблюдалась обратная ситуация (Bollmann et al., 2014; Mukherjee et al., 2016).

Исследования анаэробного окисления аммония в рифтовом озере Танганьика, занимающем по объему воды и глубине второе место в мире после озера Байкал, показали, что на его долю приходится от 7 до 13% образовавшегося N_2 . Выявлено, что анаммокс протекал на глубине 100–110 м в субоксичном водном слое. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* определено до 13 тыс. кл/мл анаммокс бактерий (1,4% от общей численности бактерий). Филогенетический анализ показал присутствие последовательностей гена 16S рНК, тесно связанных с известной анаммокс бактерией *Candidatus Scalindua brodae* (Schubert et al., 2006).

Комплексом методов изучена роль денитрификации в удалении нитратов в олиготрофном высокогорном озере Ла Кальдера (Испания). Авторы отмечают, что, несмотря на относительно низкую концентрацию нитратов, денитрификационная активность была обнаружена как в донных отложениях, так и в водной толще озера в течение всего периода исследований (в июне, августе и октябре). Максимальную активность процесса детектировали в августе. Разнообразие бактериальных денитрификаторов в озере оценивали методами культивирования и клонирования ПЦР-продуктов, используя в качестве молекулярных маркеров гены *nosZI* и *nosZII*. Среди 120 полученных последовательностей преобладали таковые некультивируемых бактерий (81,67%). Идентифицированные бактерии представлены родами *Polymorphum*, *Paracoccus*, *Azospirillum* и *Hyphomicrobium* (Alphaproteobacteria), *Thauera* (Betaproteobacteria), *Pseudomonas* и *Methylophaga* (Gammaproteobacteria). Бактерии рода *Pseudomonas* оказались наиболее распространенными и встречались в пробах на протяжении всего периода исследований. В результате культивирования изолированы бактерии всех вышеперечисленных родов и дополнительно *Arthrobacter*, *Burkholderia* и *Rhizobium*, не обнаруженные молекулярными методами. Выявленное разнообразие денитрификаторов в августе выше, чем в июне и октябре, что совпадало с самой высокой температурой воды в этот период. Методом неметрического многомерного шкалирования показано, что их численность

положительно коррелировала с температурой, концентрацией нитратов и выбросами N_2O (Castellano-Hinojosa et al., 2017).

Наиболее важными факторами, определяющими активность денитрификации, оказались концентрация кислорода, растворенного органического углерода и нитрата, как показано в озерах природного парка Руидера (Испания). Только в одном озере изменение скорости денитрификации зависело от содержания фосфора (Álvarez-Cobelas et al., 2019). Положительная корреляция между доступностью азота и денитрификационной активностью также установлена для бореальных озер (Kortelainen et al., 2000; Rissanen et al., 2011; Saarenheimo et al., 2015).

Исследование сезонных и пространственных изменений количества аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий методами культивирования в ряде озер северо-востока Китая показало, что физико-химические параметры (рН, растворенный кислород, NH_4^+ и NO_3^-) тесно связаны с распределением исследуемых групп бактерий. В сезонном аспекте прослеживается тренд возрастания численности аммонифицирующих бактерий от зимы к лету. Численность денитрифицирующих бактерий весной и осенью была выше, чем летом, а наиболее низкие значения обнаруживали в зимний период. Корреляционный анализ выявил, что на количество аммонификаторов и денитрификаторов значительно влияет концентрация азотсодержащих веществ (Zhao et al., 2015).

Сравнительно недавно в озерах Кенозерского национального парка Архангельской области (оз. Масельгское, оз. Лекшмозеро, оз. Светлое и оз. Вильно) изучена пространственно-временная динамика неорганических и органических форм азота и микроорганизмов, участвующих в их круговороте в водной толще и донных отложениях. Продемонстрировано, что во всех озерах наиболее активно протекают аммонификация, менее интенсивно нитрификация и денитрификация. Денитрифицирующие бактерии малочисленны и обнаружены только в анаэробных условиях (Воробьева и др., 2012).

В озерах Камчатского края обнаружены нарушение круговорота азота и слабая самоочищающая способность водной среды: полноценно протекает аммонификация, а стадии нитрификации и денитрификации нарушены; как следствие, в водной среде преобладает аммонийная форма азота (Кузьякина, Хурина, 2007; Голованева, Ступникова, 2020).

В пробах эпилитных биопленок литоральной зоны олиготрофных высокогорных озер в Пиренеях (Испания) обнаружено, что количество копий генов, ответственных за денитрификацию, на два порядка выше аммонийокисляющих генов и значимо коррелируют между собой, предполагая тесную связь нитрификации-денитрификации. Ранее тонкие биопленки, формирующиеся на камнях и контактирующие с водой, высоко насыщенной кислородом, считались малопригодными для обитания факультативно-анаэробных денитрификаторов. Кроме того, идентифицированы гены, кодирующие ферменты азотфиксации, в то время как для анаммокс-специфичных генов ПЦР-сигнал не получен. Среди денитрификаторов преобладали бактерии *nirK*-типа, родственные представителям класса *Alphaproteobacteria* (*Bradyrhizobiaceae*). Филогенетический анализ последовательностей гена *nifH* показал, что азотфиксаторы наиболее тесно связаны с представителями класса *Deltaproteobacteria* (*Geobacter*) и филы *Cyanobacteria* (Vila-Costa et al., 2014).

Известно, что в озерах донные места обитания (отложения и биопленки) являются «горячими точками» круговорота азота вследствие очень высоких окислительно-восстановительных градиентов в них (Melton et al., 2014). В бентосных азот-трансформирующих сообществах олиготрофных озер Пиренейского полуострова на основе определения количества копий генов, участвующих в денитрификации (*nirS*, *nirK*, *nosZ*), нитрификации (архейный и бактериальный *amoA*), диссимиляционном восстановлении нитратов до аммония (DNRA, *nrfA*) и анаэробном окислении аммония (*hdh*) установлено, что диссимиляционные нитратредукторы (*nrfA*) преобладали в отложениях, за исключением поверхностного слоя более продуктивных озер, где

доминировали денитрификаторы *nirS*-типа (Palacin-Lizarbe et al., 2019). В биопленках наблюдали сложную структуру азот-трансформирующих сообществ, отличную от таковой в отложениях. Здесь обнаружено повышенное содержание генов *hdh* и *nosZ*, что может свидетельствовать о более интенсивной потере азота в форме N_2 в эпилитных биопленках по сравнению с отложениями. По мере увеличения продуктивности озер уникальный состав сообщества биопленок (*nosZI*, *hdh*, *nirK*) изменялся и становился более схожим с сообществом поверхностных отложений, где количество последовательностей гена *nirS* больше, чем *nirK*. Полученная оценка большей численности *nirS*-содержащих бактерий не согласуется с данными предыдущих исследований эпилитных биопленок тех же озер, где среди денитрификаторов преобладали бактерии *nirK*-типа (Vila-Costa et al., 2014). Основное различие между этими работами заключается в том, что одни исследователи отбирали биопленку только с верхней части каменного субстрата (Vila-Costa et al., 2014), тогда как другие с обеих сторон (Palacin-Lizarbe et al., 2019). Ранее, при исследовании аммонийоокисляющих сообществ биопленок сообщалось о различиях между верхней (светлая сторона) и нижней (темная сторона) частями камней (Merbt et al., 2017).

1.4.2. Исследования процессов круговорота азота на оз. Байкал

Оз. Байкал – крупнейшее пресное озеро в мире – характеризуется исключительным биологическим разнообразием. Воды озера относятся к гидрокарбонатно-кальциевым водам первого типа (Вотинцев, 1961), для которых свойственна крайне низкая минерализация. Содержание биогенных элементов в воде оз. Байкал, в том числе азота, подвержено в поверхностных слоях (до глубины 100-250 м) закономерным сезонным изменениям, обусловленным не только климатическими и гидрофизическими условиями, но и в значительной степени биологическими и биохимическими процессами. С глубиной содержание биогенных элементов увеличивается, концентрация (мг/л) свободного азота (N_2) изменяется в пределах от 17,27 (0 м) до 20,24

(1400 м), нитратного от 0,30 (0 м) до 0,54 (1400 м). В период массового развития водорослей в слое 0-10 м концентрация нитратного азота может снижаться до аналитического нуля (Галазий, 2017). По результатам многолетних наблюдений водные массы пелагиали Байкала относят к олиготрофному типу (Khodzher et al., 2017).

Вдоль всего западного побережья озера на сотни километров тянется полоса каменистой литорали, охватывающая глубины до 15-20 метров, за которыми далее следует крутой свал (Кожов, 1962). Литоральная зона характеризуется особыми температурными условиями (Россолимо, 1957), динамикой концентрации биогенных элементов и растворенных газов (Вотинцев, 1961; Сакирко, 2012). В последнее время в прибрежных участках озера наблюдаются крупномасштабные изменения: повышенная концентрация биогенных веществ в воде, включая органический и минеральный азот, изменение структуры и поясности фитобентоса, массовая гибель эндемичных губок и моллюсков, интенсивное развитие нитчатых водорослей и цианобактерий, в том числе и токсин-продуцирующих (Kravtsova et al., 2014; Timoshkin et al., 2016; Белых и др., 2017; Khodzher et al., 2017; Timoshkin, 2018; Afonina, 2021).

Основные процессы круговорота веществ в мелководной части озера происходят с участием микробного сообщества биопленок, сформированных на каменистых субстратах, называемого эпилитомом. Первые сведения по изучению бактерий, участвующих в превращениях азотсодержащих соединений в эпилите каменистой литорали оз. Байкал, получены А.Г. Родиной. Содержание сапрофитных бактерий на различных участках камней составляло от 11 тыс. до 300 тыс. КОЕ/см²; нитрифицирующие бактерии обнаружены в 30% исследованных проб, *Azotobacter* – в 90% посевов, *Clostridium* – в 100%, денитрифицирующие бактерии выявлены всего в 10% (Родина, 1954).

Открытая водная зона оз. Байкал достигает наибольшей глубины (1642 м) в средней котловине, максимальная глубина южной котловины – 1432 м.

Исследования бактерий круговорота азота в водной толще и грунтах Южного Байкала представлены в работах А.П. Романовой. Согласно автору, бактерии родов *Azotobacter* и *Clostridium* в водной толще не встречаются. Нитрифицирующие бактерии обнаружены в минимальных количествах (2-5 клеток в 100 мл воды), а денитрифицирующие бактерии в открытой части Байкала практически отсутствовали, что, очевидно, связано с минимальными количествами доступного органического вещества и аэробными условиями существования в байкальской воде (Романова, 1961). Экологическая ниша иловых отложений глубоководной части Байкала в противоположность водной массе содержала 4-200 тыс. клеток аммонификаторов и 10-1000 клеток *Nitrosomonas* и *Nitrobacter* на 1 г ила (Романова, 1961), что обуславливало увеличенное содержание аммиака до 1,5 мг N/NH₄⁺/л (Вотинцев, 1961) и повышенную нитрификационную способность ила. Бактерии рода *Azotobacter* найдены в поверхностном слое ила 0-2,5 см в количестве 1-10 кл/г, *Clostridium* – до 1000 кл/г. Количество денитрифицирующих бактерий, как и в воде, было не высоким – от 1 до 10 кл/г ила (Романова, 1961).

В период с 1976 г. по 1980 г. проведено исследование распределения микроорганизмов круговорота азота в водной толще по всей акватории озера. Полученные результаты показали, что планктонные микроорганизмы, участвующие в круговороте азота, сильно рассеяны в пространственном отношении, интенсивность всех процессов слабая. Содержание аммонификаторов и способность к потенциальной нитрификации по вертикали неодинаковы, показатели были выше в трофогенном слое, затем снижались с глубиной, вновь увеличиваясь в придонном слое. Количество аммонифицирующих бактерий в 1976 г. в среднем составляло 32 кл/мл, в 1978 г. – 12 кл/мл, в 1980 г. – 48 кл/мл. Численность аэробных азотфиксаторов изменялась от 1 до 37 кл/мл в 1978 г. и от 5 до 75 кл/мл в 1980 г. Денитрифицирующие бактерии в водной толще регистрировались в виде локальных зон, их численность изменялась от 10 до 100 кл/л (Верхозина, 1985).

Ряд работ по определению численности бактерий, минерализующих азотсодержащие органические соединения, в различных биотопах оз. Байкал проведены также в 70-80-е годы прошлого века. Численность сапрофитных бактерий в водной толще Южного Байкала в среднем составляла около 5 кл/мл, в поверхностном слое во время массового развития фитопланктона достигала 20 кл/мл (Максимова, Максимов, 1972). Численность сапрофитов в поверхностном микрослое воды была высокой, достигая 12 000-105 000 кл/мл (Никитин, 1983).

В недавних исследованиях биопленочных сообществ, сформированных на каменистых субстратах в районе Южного Байкала (от пади Черная до пос. Большие Коты), установлено, что в летнее время численность сапрофитных бактерий на разных камнях колебалась в большом диапазоне и составляла от 100 до 160 000 КОЕ/см². В водной толще прибрежной зоны озера численность сапрофитов находилась в пределах от 4 до 82 КОЕ/мл (Мальник, 2010).

В результате эколого-микробиологических исследований биопленок каменистых субстратов в литоральной зоне Южного Байкала (август 2012 г.) выявлено, что в районах значительного антропогенного влияния число органотрофных микроорганизмов на порядок выше, чем в фоновом районе пос. Большие Коты (тыс. КОЕ/см²): в районе Байкальского целлюлозно-бумажного комбината – $630,6 \pm 79,4$, пос. Листвянка – $430,2 \pm 188,6$, г. Слюдянка – $220,5 \pm 39,6$, пос. Б. Коты – $33,8 \pm 12,8$ (Сулова и др., 2018).

Исследование микробных сообществ поверхностного микрослоя воды по всей акватории оз. Байкал (2013–2016 гг.) показало, что численность гетеротрофных бактерий в весенний период в поверхностном микрослое составляла в среднем 715 ± 206 КОЕ/мл, в подповерхностном слое воды – 100 ± 26 КОЕ/мл. В летний период численность гетеротрофных бактерий в указанных слоях воды составляла в среднем 13390 ± 3970 и 905 ± 147 КОЕ/мл соответственно (Галачьянц, 2017). Автор полагает, что численность гетеротрофных бактерий зависит от температуры воды, определяемой временем года, а также от концентрации органических веществ. Повышенные

значения численности гетеротрофных бактерий в поверхностной пленке связаны, вероятно, с более высокой концентрацией органических веществ.

В начале 2000-х гг. впервые из проб воды оз. Байкал выделена и охарактеризована факультативная метилотрофная бактерия рода *Huphromicrobium*, способная к проведению аэробной денитрификации (Коваadlo, 2009).

В донных отложениях оз. Байкал обнаружены нитрификаторы семейства *Nitrospiraceae*, филы *Nitrospirae* и филума *Thaumarchaeota* (Lomakina et al., 2014; Черницына и др., 2016; Земская и др., 2018). В образцах водной толщи пелагической станции Южного Байкала с использованием подхода MAG (metagenome-assembled genome) выявлены геномы представителей *Nitrospirae* и *Thaumarchaeota*. В глубинных горизонтах (1250 м, 1350 м), где представители данных таксонов составляли значительную долю микробного сообщества, нитрификация и метилотрофия являются ключевыми путями производства энергии (Cabello-Yeves et al., 2018; Cabello-Yeves et al., 2020).

В последние годы молекулярными методами изучено таксономическое разнообразие азотфиксирующих цианобактерий в биопленках и планктоне литорали озера. С применением в качестве молекулярного маркера гена *nifH* выявлено, что разнообразие азотфиксирующих цианобактерий в планктоне озера представлено родами *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Nostoc* и *Trichormus*, в биопленках на твердых субстратах – родами *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Rivularia* и *Tolypothrix*. Отмечено высокое генетическое разнообразие азотфиксаторов порядка *Nostocales*. Выявлен новый для Байкала азотфиксирующий род *Trichormus*, представленный видом *Trichormus variabilis* (Гладких, 2012).

Таким образом, до настоящего времени бактериальные процессы круговорота азота в оз. Байкал остаются малоизученными. Применение комплекса методов исследований, в том числе современных молекулярно-биологических, позволит более подробно изучить микробные сообщества

литоральной зоны оз. Байкал, участвующие в превращениях азотсодержащих соединений.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования, отбор проб и подготовка к анализу

Материалом для исследования послужили пробы воды, поверхностного микрослоя воды и эпилитных биопленок, отобранные в литоральной зоне оз. Байкал. Отбор проб осуществляли в ходе экспедиций (НИС «Академик Коптюг», НИС «Титов») в 2017–2019 гг. (табл. 1).

Таблица 1 – Характеристика станций отбора проб в литоральной зоне оз. Байкал

Станция	Координаты; глубина озера в месте отбора	Дата отбора
Пос. Листвянка (напротив нерпинария) – район в черте поселения, активно посещаемый жителями и туристами	51°50'41.92"N 104°52'31.04"E; 1-1,5 м	28.06.17, 27.09.17, 23.06.18, 16.09.18, 05.06.19, 12.09.19
	51°50'66.0"N, 104°52'45.7"E; 10-15 м	05.08.19
Напротив пос. Большие Коты – фоновый район, территория Прибайкальского национального парка	51°53'93.0"N, 105°03'83.8"E; 10-15 м	04.08.17, 05.08.19
Напротив пос. Большое Голоустное – район в черте поселения, посещаемый жителями и туристами	52°1'36.30"N, 105°24'16.20"E; 1-1,5 м	17.06.17, 19.09.17, 15.06.18, 20.09.18, 07.06.19, 17.09.19
	52°1'36.5"N 105°24'11.8"E; 10-15 м	04.08.17, 06.08.19
Вблизи бух. Ая	52°49'49.86"N 106°42'13.38"E; 10-15 м	06.08.17, 07.08.19
Прол. Ольхонские Ворота	53°00'91.5"N, 106°55'72.2"E; 10-15 м	05.08.17, 07.08.19
Бух. Пещерка (о-в Большой Ушканий) – территория Забайкальского национального парка	53°51'12.53"N, 108°39'40.68"E; 1-1,5 м	11.06.17, 26.09.17, 10.06.18, 25.09.18, 11.06.19, 20.09.19
м. Елохин – территория Байкало-Ленского заповедника. Труднодоступный район, в 2016 г. подвергся сильному лесному пожару	54°32'29.76"N, 108°39'39.42"E; 1-1,5 м	13.06.17, 22.09.17, 11.06.18, 26.09.18, 14.06.19, 21.09.19
г. Северобайкальск (напротив городского пляжа) – активно посещаемый песчаный пляж в городской черте	55°37'49.8"N, 109°21'1.7"E; 1-1,5 м	14.06.17, 24.09.17, 13.06.18, 27.09.18, 12.06.19, 22.09.19

Таблица 2 – Каменистые субстраты с биопленками, отобранные в июне и сентябре 2017 г.

Станция, биопленки	описание	Июнь	Сентябрь
пос. Листвянка	В июне обрастания зелено-коричневого цвета, толщина около 0,25 см; в сентябре слизистые полупрозрачные, толщина не определяется		
пос. Б. Голоустное	В июне обрастания бурого цвета, толщина около 1 см; в сентябре зелено-коричневого цвета, толщина около 0,5 см		
бух. Пещерка	В июне обрастания зеленоватого цвета, толщина около 0,1 см; в сентябре буро-коричневые, толщина около 1 см		
м. Елохин	В июне обрастания бурозеленого цвета, толщина около 0,2 см; в сентябре коричнево-черного цвета, толщина 0,4-0,5 см		
г. Северобайкальск	В июне бурые слизистые обрастания, толщина около 0,3 см; в сентябре коричнево-зеленые, толщина 0,1-0,2 см		

Пробы воды отбирали батометром или шприцами Жанэ в стерильные стеклянные флаконы. Пробы поверхностного микрослоя отбирали стерильной металлической сеткой в стерильный контейнер (Galachyants et al., 2018). Камни помещали в стерильные контейнеры, которые наполняли окружающей их водой с целью предотвращения высыхания (табл. 2). Все пробы отбирали в трех повторностях.

Подготовку эпилитона для микробиологического исследования проводили в лаборатории следующим образом: с поверхности камня площадью 1 см² стерильным скальпелем делали соскоб в пробирку с 10 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно встряхивали ее в течение 10 мин. Полученную суспензию использовали для приготовления ряда последовательных десятикратных разведений, из которых производили высеивание на селективные среды. Пробы, предназначенные для выделения ДНК, после отбора упаковывали в стерильную фольгу и замораживали до момента их анализа в лаборатории.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Микробиологические методы

Учет и выделение бактерий, участвующих в круговороте азота, проводили на селективных средах по общепринятым в микробиологии методам.

Численность аммонификаторов определяли методом предельных разведений в пептонной воде (г/л): пептон – 5; KH_2PO_4 – 1; K_2HPO_4 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; NaCl – 0,5. Накопление NH_3 в среде устанавливали при помощи реактива Несслера. На предметное стекло помещали каплю исследуемой культуральной жидкости и вносили каплю реактива Несслера: при большом количестве NH_3 образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом – появляется оранжевая или желтая окраска.

Численность денитрификаторов определяли методом предельных разведений в жидкой среде Гильтая (г/л): готовили I раствор (KNO_3 – 2; H_2O –

250 мл) и II раствор (KH_2PO_4 – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 2; CaCl_2 – 0,2; натрий лимоннокислый – 2,5; FeCl_3 – следы; H_2O – 500 мл), оба раствора сливали в колбу и доводили объем до 1000 мл. По индикатору бромтимоловому синему устанавливали pH равным 7. В пробирки со средой помещали стеклянный поплавочек, запаянным концом кверху. По окончании опыта регистрировали следующие признаки: накопление газа в поплавке, изменение цвета среды с зеленого на синий. Кроме того, определяли наличие в среде нитритов при помощи реактива Грисса.

Чистые культуры денитрифицирующих бактерий получали на вышеуказанной агаризованной среде, отсевая колонии с различной морфологией методом истощающего штриха.

Для микробиологических данных рассчитывали такие статистические показатели, как среднее значение и стандартное отклонение (SD). Количественные данные по распределению денитрификаторов в августе были \log_{10} трансформированы. Для выявления зависимости между параметрами применяли коэффициенты корреляции Спирмена и Пирсона. Различия между выборками оценивали с помощью критериев Манна-Уитни и Краскела-Уоллиса. Статистический анализ данных проводили в программе R-Studio 3.6.2.

Изучение морфологических свойств исследуемых культур

Для определения морфологии клеток готовили фиксированные окрашенные препараты, для определения подвижности – препарат «раздавленная капля» (Практикум..., 2005). Препараты наблюдали в световой микроскоп Axiostar Plus («Carl Zeiss», Германия) при увеличении $\times 100$. Грам-принадлежность культур определяли с помощью теста Греггера. На предметное стекло наносили каплю 3%-ного водного раствора КОН, в которую бактериологической петлей вносили бактериальную биомассу, раствор суспендировали в течение 30 с. В случае образования вязких слизистых нитей, тянущихся за петлей, исследуемые клетки относили к

граммотрицательным, если вязкость суспензии не изменялась, то к грамположительным (Лысак, Игнатенко, 2015).

Изучение физиолого-биохимических признаков выделенных штаммов

Определение оксидазной активности проводили с помощью индикаторных тест-полосок «Окситест» («Erba-Lachema», Чехия). При помощи стерильной деревянной палочки биомассу втирали в зону индикации. Результат учитывали по появлению синей окраски. В качестве отрицательного контроля использовали *Escherichia coli*, положительного – *Pseudomonas fluorescens*.

Каталазную активность культур выявляли следующим образом: на предметном стекле суспендировали биомассу исследуемого штамма в капле 3%-ного раствора перекиси водорода. Положительный результат отмечали при появлении пузырьков газа (кислорода).

Фосфатазную активность бактерий определяли, используя коммерческий набор щелочная фосфатаза-Витал («Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия). Для этого в плашку помещали по 0,25 мл реагента, затем с помощью петли вносили бактериальную биомассу. Инкубировали при комнатной температуре 24 часа, положительный результат отмечали по появлению ярко-желтого окрашивания.

Амилолитическую активность исследовали на среде следующего состава (%): пептон – 1,0; KH_2PO_4 – 0,5; растворимый крахмал – 0,5; агар – 1,5. Проводили посев культуры уколом, культивировали в течение 7 суток, после чего агаровую пластинку заливали раствором Люголя. Так как йод является индикатором присутствия крахмала, то вся среда окрашивается в синий цвет, за исключением зоны гидролиза крахмала, которая остается бесцветной или может приобрести красно-бурую окраску, если крахмал гидролизировался до декстринов (Руководство..., 1983).

Протеолитическую активность выявляли на молочном агаре и мясо-пептонной желатине. Проводили посев культуры уколом. Учет результатов

протеолиза казеина выполняли на 3-5 сутки культивирования при комнатной температуре, измеряя диаметр зоны просветления вокруг колонии. Результаты протеолиза желатины оценивали на 1-3 сутки культивирования при комнатной температуре по диаметру воронки, образующейся вокруг колонии (Руководство..., 1983).

Лецитиназную активность определяли на желточном (гидролиз фосфолипидов) агаре. Для приготовления желточного агара к 100 мл голодного агара (50°C) добавляли стерильный «яичный раствор» (яичный желток, разведенный 1:1 0,85% раствором NaCl). Посев культуры выполняли уколом, штаммы культивировали в течение 7 суток. Полученные результаты учитывали по диаметру зоны просветления вокруг колонии.

Эксперимент по изучению влияния источника азота на образование биопленок гетеротрофными бактериями

В исследовании использованы чистые культуры штаммов: *Rhizobium* sp. 2A, *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21A. Штамм *Rhizobium* sp. 2A выделен на безазотистой среде Эшби из проб поверхностного микрослоя воды, *Pseudomonas* sp. 1СБ на среде Гильтая из эпилитной биопленки. Штамм *Streptomyces* sp. 21A изолирован из тела губки и был любезно предоставлен И.А. Липко из коллекции лаборатории водной микробиологии. Секвенирование полного генома *Streptomyces* sp. 21A показало, что бактерия включает гены, кодирующие синтез ферментов, осуществляющих ассимиляционное восстановление нитратов до аммония – наиболее биодоступной формы азота.

Штаммы высевали на твердую среду (*Rhizobium* sp. 2A на Эшби, *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21A на R2A) и культивировали в течение 5 суток при комнатной температуре. Затем готовили суспензию: выращенную клеточную биомассу бактериальной петлей переносили в 5 мл стерильной байкальской воды и тщательно перемешивали. Готовили два варианта жидкой среды Эшби с сахарозой по 60 мл в колбах на 100 мл: безазотистую и с добавлением KNO_3 – 1 г/л. Приготовленную среду засекали

2 мл суспензии клеток исследуемых штаммов, перемешивали и вносили по 25 мл в стерильные чашки Петри с покровными стеклами. Контрольные чашки Петри со стеклами заливали стерильной средой.

Культивирование проводили при 22-24°C в течение 7 суток. Результаты снимали в двух повторностях на 3, 5, 7 сутки культивирования. Стекла извлекали из среды стерильным пинцетом, затем отмывали в стерильной воде и подготавливали для *сканирующей электронной микроскопии*. Образцы на стеклах фиксировали в течение одного часа 2,5%-ным раствором глутарового альдегида на фосфатном буфере, затем проводили обезвоживание препарата в серии спиртов восходящей концентрации (30% – 10 минут, 50% – 10 минут, 70% – 10 минут, 96% – 10 минут), после чего высушивали в термостате при 65°C. Стекла приклеивали к столику с помощью двустороннего скотча, напыляли золотом и просматривали в сканирующий электронный микроскоп FEI Company Quanta 200 («FEI Company», США).

2.2.2. Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК

Суммарную ДНК выделяли из проб методом фенол-хлороформной экстракции. К 100 мкл образца добавляли 300 мкл трис-солевого буфера и 30 мкл лизоцима (10 мг/мл) до конечной концентрации лизоцима 1 мг/мл. Оставляли на 1,5 часа при 37°C. Затем добавляли 25 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и инкубировали еще 1,5 часа при 37°C. Добавляли 35,5 мкл 10%-ного SDS (до конечной концентрации 1% SDS в растворе) и выдерживали 1,5 часа при 37°C. Далее замораживали при -70°C 20 мин, после чего прогревали при 56°C 20 мин. На следующем этапе белки и полисахариды экстрагировали фенолом и хлороформом. Для этого добавляли равный объем смеси 1:1 фенола и хлороформа-изоамилового спирта (24:1). Перемешивали и выдерживали 10 мин, затем центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Отбирали верхнюю водную фазу в стерильную пробирку. Повторяли экстракцию смесью хлороформ-изоамиловый спирт, как описано выше. Водную фазу переносили

в стерильную пробирку, оценивая ее объем. Добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия и два объема холодного (-20°C) этанола для осаждения ДНК. Оставляли на 12 часов при температуре -20°C . Центрифугировали в течение 20 мин при 13000 об/мин. Супернатант сливали и осадок дважды промывали холодным 70%-ным этанолом (200 мкл). Далее сливали этанол, пробирку с осадком нуклеиновых кислот немного подсушивали на воздухе. Осадок растворяли в 50 мкл буфера TE.

Выделение ДНК из чистых культур микроорганизмов проводили с помощью набора «ДНК-сорб В» по протоколу фирмы-производителя («АмплиСенс», Россия). Для выделения использовали 100 мкл клеточной суспензии.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Аmplификацию фрагментов гена 16S рРНК чистых культур проводили с консервативными бактериальными праймерами 27F-1492R (табл. 3), используя следующий режим реакции: активация полимеразы при 95°C – 15 мин, затем 30 циклов: денатурация 94°C – 30 сек, отжиг 58°C – 30 сек и элонгация 72°C – 90 сек, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 7 мин.

Аmplификацию фрагментов гена 16S рРНК (регион V3–V4) для высокопроизводительного секвенирования проводили на праймерах 343F-806R (табл. 3) в следующем режиме: активация полимеразы при 94°C – 9 мин, 50 сек; 25 циклов: денатурация 94°C – 30 сек, отжиг 58°C – 30 сек, элонгация 72°C – 45 сек; заключительная элонгация 72°C – 8 мин.

Аmplификацию фрагментов генов nirK и nirS проводили с помощью праймеров F1aCu-R3Cu и cd3aF-R3cd, соответственно (табл. 3). Режим ПЦР: активация полимеразы при 95°C – 15 мин; 35 циклов: денатурация ДНК 95°C – 30 сек, отжиг 57°C (*nirK*) и 55°C (*nirS*) – 60 сек, элонгация 72°C – 60 сек; заключительная элонгация 72°C – 10 мин.

Аmplификацию на плазмидных праймерах проводили для определения клонов, содержащих вставки ожидаемых размеров с помощью плазмидных

праймеров M13F-M13R. Режим ПЦР: активация полимеразы при 95°C – 15 мин; 25 циклов: денатурация 94°C – 45 сек, отжиг 55°C – 30 сек, элонгация 72°C – 50 сек, в последнем цикле время элонгации увеличивали до 7 мин.

ПЦР проводили в амплификаторе БИС («БИС-Н», Россия), используя наборы Taq М Мастер-микс («Алкор Био», Россия) и БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x) («Биолабмикс», Россия). Ампликоны анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле в 1×TAE-буфере с добавлением бромистого этидия (конечная концентрация 2 мкг/мл), визуализировали на трансиллюминаторе («VL-6.МС», Франция) и очищали.

Таблица 3 – Праймеры, используемые в работе

Ген	Название	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Источник
16S рРНК	27F	AGAGTTTGGATCATGGCTCAG	Lane et al., 1991
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Turner et al., 1999
	343F	CTCCTACGGRRSGCAG	Martemyanov et al., 2016
	806R	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	Martemyanov et al., 2016
<i>nirK</i>	F1aCu	ATCATGGT(C/G)CTGCCGCG	Hallin, Lindgren, 1999
	R3Cu	GCCTCGATCAG(A/G)TTGTGGTT	
<i>nirS</i>	cd3AF	GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGA(A/G)AC(C/G)GG	Michotey et al., 2000
	R3cd	GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA	Throbäck et al., 2004

Клонирование продуктов амплификации

Для клонирования ПЦР-продуктов, содержащих фрагмент гена *nirK*, использовали плазмидный вектор pAL2-T Quick-TA kit («Евроген», Россия).

Лигирование проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкл лигазного буфера, 1 мкл Т4 ДНК-лигазы, 1 мкл вектора (50 нг/мкл), 2 мкл безбактериальной воды и 5 мкл ПЦР-продукта. Лигазную смесь инкубировали 14-16 часов при 14°C и использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* (штамм XL-1).

Для трансформации в каждую пробирку с компетентными клетками (100 мкл) добавляли 10 мкл лигазной смеси и инкубировали во льду 30 мин. Затем проводили «тепловой шок» при 42°C в течение 90 сек. Далее пробирки охлаждали во льду 2 мин, после чего добавляли по 500 мкл среды SOC и инкубировали полученную суспензию 1 час при 37°C. Для бело-голубого скрининга колоний, полученных после трансформации клеток лигазной смесью, клетки высевали на чашки Петри с твердой средой LB, содержащей 20 мкг/мл ампициллина и 0,0005% X-gal. Чашки инкубировали 12 часов при 37°C. После инкубации все выросшие колонии белого цвета суспендировали в 20 мкл безбактериальной воды. Суспензию клеток кипятили в течение 5 мин при 95°C, после чего замораживали при -20°C, оттаивали при комнатной температуре, центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин и использовали в ПЦР на плазмидных праймерах.

Ампликоны, соответствующие по размерам вставкам анализируемых фрагментов гена *nirK*, вырезали и подготавливали к секвенированию по методу Сэнгера: замораживали на ночь при -20°C, затем центрифугировали на центрифуге при 12000 об/мин 15-20 мин. Элюированный материал (5 мкл) высушивали с 1 мкл прямого или обратного праймера из набора для клонирования при 60°C. Секвенирование проводили в компании «Синтол» (Россия).

Биоинформатический анализ и статистическая обработка данных

Нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК и *nirK*, полученные секвенированием по методу Сэнгера, редактировали с помощью программы BioEdit (Hall, 1999). Поиск гомологичных последовательностей выполняли, используя BLAST-анализ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Нуклеотидные последовательности гена *nirK* переводили в аминокислотные. Далее аминокислотные последовательности, сходные более чем на 95%, объединяли в группы (операционные таксономические единицы, ОТЕ) и на основе полученных ОТЕ рассчитывали индексы биоразнообразия в программе Mothur 1.39.5 (<http://www.mothur.org>). Дерево аминокислотных

последовательностей фрагмента гена *nirK* конструировали, применяя Байесовский анализ с помощью программы MrBayes v. 3.2.6 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). В программе запускали два независимых анализа МСМС (Markov chain Monte Carlo), в течение 20 млн генераций, параметр отжига 25% (отбрасывание начальных генераций), 4 цепи (одна холодная и три горячих). Трассировочные файлы, сгенерированные в ходе МСМС, анализировали с помощью Tracer v.1.6 (Rambaut, 2013).

Филогенетическое дерево фрагментов гена 16S рРНК было построено с использованием метода объединения ближайших соседей (*neighbor-joining*) в программе MEGA 7 (Kumar et al., 2016).

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *nirK* депонированы в базу данных GenBank под номерами МК460600-МК460761.

В кластерный анализ брали последовательности фрагмента гена *nirK*, полученные в данном исследовании методом Сэнгера и доступные в базе NCBI из различных источников: эпиплитные биопленки горных озёр в Пиренеях (АНН31340–АНН31397); осадки озёр бассейна р. Янцзы (АМТ92022–АМТ92070); осадки оз. Дунху (AGF35199–AGF35221); водная толща и придонная вода озёр Плюсзее и Шохзее (ABD36621–ABD36689); водная толща устья Желтой реки (АНН58230–АНН58377); микробные маты Северного моря (AIG14473–AIG14977); Аравийское море (ABW35156–ABW35285); осадки залива Сан-Франциско (ADM93837–ADM94219); сточные воды (Китай) (АНЗ19345–АНЗ19914); лесная (ARO48700–ARO48752) и пахотная (АНУ29492–АНУ29541) почвы (Китай). На основе аминокислотных последовательностей получали матрицу дистанций метрикой UniFrac, с последующим использованием иерархического кластерного анализа (*hclust*) (Murtagh, 1992) методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA), применяя пакеты *phyloseq* v. 1.21.0 и *phangorn* v. 2.2.0, реализованные в программе R v. 3.2.4.

Высокопроизводительное секвенирование

Ампликоны, полученные с праймерами 343F-806R, F1aCu-R3Cu и cd3aF-R3cd (табл. 3), очищали с помощью CleanMag DNA («Евроген», Россия), определяли количественно и смешивали в молярных соотношениях. Библиотеки из ампликонных смесей готовили с использованием набора Nextera XT kit (Illumina, США) и секвенировали на платформе MiSeq (Illumina, США) в центре «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск). Полученные данные депонированы в архив SRA (NCBI) под номером PRJNA613961.

Оценку качества библиотек ампликонов проводили, используя программу Fast-QC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), праймеры и ложные последовательности были удалены с помощью программы cutadapt v.1.14 (Martin, 2011). Дальнейшая обработка последовательностей была выполнена в программе DADA2 (параметры: maxN = 0, maxEE = c(2,4)), включая выравнивание, фильтрацию химер, коротких и ложных последовательностей, и их кластеризацию в уникальные варианты (ESV) (Callahan et al., 2016).

Фрагменты последовательностей гена 16S рРНК были выравнены, сгруппированы в операционные таксономические единицы (ОТЕ, дистанция 0,03) и идентифицированы с использованием базы данных SILVA v.132 (Quast et al., 2013) в mothur v.1.40.0 (Schloss et al., 2009). Дерево максимального правдоподобия для выравненных фрагментов гена 16S рРНК построено в программе MEGA X (Kumar et al., 2018) с бутстреп семплированием и применением модели замен K2P + G + I на основе результатов инструмента jmodeltest (Posada, 2008).

Нуклеотидные последовательности фрагментов функциональных генов транслировали в аминокислотные последовательности и идентифицировали с помощью алгоритма BLASTp в базе данных NCBI-NR. Нуклеотидные последовательности кластеризовали при 95% уровне сходства и использовали для дальнейшего анализа. Филогенетические деревья для функциональных генов были сконструированы методом байесовской цепи Маркова Монте-Карло (MCMC) в программе BEAST v.1.10.4 (Suchard et al., 2018) с моделью

замен НКУ + G + I и 2 миллионами генераций. Результаты анализировали в Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al., 2018).

Статистический анализ проводили с помощью пакета *vegan* v.2.6-4 (Oksanen et al., 2007) с использованием языка R. Для анализа альфа- и бета-разнообразия применяли данные со случайной частичной выборкой по наименьшему значению. Альфа-разнообразие анализировали с помощью индексов Чao1 и Шеннона, бета-разнообразие – методом UPGMA. Канонический анализ избыточности (RDA) выполняли в R, используя пакет *vegan* v.2.6-4.

2.2.3. Физико-химические методы

Определение гидрохимических компонентов в пробах воды по стандартным методам (Wetzel, Likens, 2000; Руководство..., 2009) проводили сотрудники лаборатории гидрохимии и химии атмосферы ЛИН СО РАН к.г.н., с.н.с. И. В. Томберг, н.с. Н. А. Жученко и м.н.с. Е. В. Елецкая.

Пробы воды фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (Advantec, Япония). Содержание нитратов и нитритов измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии («ЭкоНова», Россия) с УФ-детектированием на колонке с обращенной фазой, модифицированной октадецилтриметиламмония бромидом (Khodzher et al., 2016). Определение концентрации ионов аммония проводили на спектрофотометре UNICO (США) с индофенолом. Фосфаты определяли методом Дениже-Аткинса в модификации с хлористым оловом. Общий органический углерод определяли в нефльтрованной пробе анализатором общего углерода / азота Vario TOC cube (Elementar, Германия). Общий фосфор определяли в нефльтрованной пробе фотометрическим методом восстановления хлористым оловом после окисления персульфатом калия по ГОСТ 18309 – 2014 (метод «Г»), общий азот согласно РД 52.24.532-2016 (вариант 2).

Химический анализ эпилитных биопленок

Количество хлорофилла «а» определяли по методу, описанному ранее (Henriques et al.; 2007). Высушенные на воздухе образцы биопленок исследовали на CHN-анализаторе в ЦКП ИрИХ СО РАН (Flash EA 1112 CHNS, ThermoFinnigan, Италия). Также из этих образцов была приготовлена суспензия в деионизованной воде с расчётом, чтобы содержание органического фосфора не превышало 1 мг/л. Содержание общего фосфора в образцах полученных суспензий определяли методом персульфатного сжигания согласно рекомендациям пробоподготовки (Kahlert, 2002; Qin, 2007; Liess, 2009) по ГОСТ 18309 – 2014 (метод «Г»). Содержание фосфора в суспензии пересчитывали на содержание в граммах сухого веса эпилитных биопленок. Учитывая, что в деионизованной воде не содержатся фосфат-ионы, весь общий фосфор в образцах представлен в органической форме. Концентрации элементов переводили в молярную размерность. Элементный состав в высушенных образцах определяли с помощью ICP MS масс-спектрометра Agilent 7500 (США).

ГЛАВА 3. ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ КРУГОВОРОТА АЗОТА В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗ. БАЙКАЛ

3.1. Сезонно-пространственное изменение численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилимнине в июне и сентябре 2017-2019 гг.

В июне и сентябре исследовали районы в южной и северной котловинах: напротив пос. Листвянка, пос. Большое Голоустное, бух. Пещерка, м. Елохин и г. Северобайкальск (вблизи городского пляжа). Глубина озера в месте отбора составляла 1-1,5 м.

Бухта Пещерка расположена на Большом Ушканьем острове, который входит в состав Забайкальского национального парка, м. Елохин находится на территории самого крупного заповедника оз. Байкал – Байкало-Ленского. Следует отметить, что осенью 2016 г. масштабные пожары в районе м. Елохин практически уничтожили прибрежную тайгу.

Температура, рН и минеральные формы азота. В прибрежных водах озера в период исследования величина рН изменялась в июне от 7,64 до 9,2, в сентябре от 7,69 до 8,52. Температура воды в июне варьировала от 3,8°C до 14,2°C, в сентябре от 6,9°C до 13,4°C.

Нитриты в большинстве случаев либо не регистрировали, либо их концентрация не превышала 1 мкг N/л. Высокая концентрация нитритов (5 мкг N/л) выявлена в июне 2017 г. на станции м. Елохин в придонной воде, в сентябре 2018 г. на станциях м. Елохин и г. Северобайкальск в поверхностной (3 и 5 мкг N/л соответственно) и придонной (4 и 7 мкг N/л соответственно) воде. Концентрации аммонийного азота в основном были небольшие: в поверхностном горизонте до 0,027 мг N/л, в придонном – до 0,032 мг N/л. Максимальную концентрацию аммония наблюдали в пробах придонной воды на станции м. Елохин в сентябре 2017 г. – 0,045 мг N/л. Нитратный азот в 2017 г. во всех пробах детектировали в небольших концентрациях – от 0,01 до 0,05 мг N/л. В 2018 г. концентрация нитратов составляла от 0,01 до 0,15 мг N/л, максимальные значения обнаружены в июне в пробах поверхностной воды на

станциях зал. Лиственничный (0,10 мг N/л) и м. Елохин (0,15 мг N/л). В 2019 г. концентрация нитратов варьировала от 0,01 до 0,16 мг N/л, наиболее высокие значения регистрировали в июне в придонном слое воды на станциях зал. Лиственничный (0,16 мг N/л) и м. Елохин (0,13 мг N/л) и в сентябре в поверхностной и придонной воде на станции м. Елохин (0,10 и 0,11 мг N/л соответственно).

Наблюдаемое увеличение концентраций минеральных форм азота в прибрежных водах озера на отдельных станциях свидетельствует о загрязнении вод. Станция напротив м. Елохин – заповедная и малопосещаемая территория. Тот факт, что именно здесь обнаружены высокие концентрации нитритного азота (до 5 мкг N/л) и в июне, и в сентябре, свидетельствует о загрязнении. Причинами нитритного загрязнения могут быть как сами пожары – источники органического и неорганического азота, так и разложение водорослей *Spirogyra* и *Ulothrix*, биомасса которых вследствие интенсивного развития – явления ранее несвойственного для Байкала, была высокой. Также нами отмечено увеличение нитритов, являющихся промежуточным продуктом минерализации, на станции вблизи г. Северобайкальск в осенний сезон. Вследствие сброса недостаточно очищенных сточных вод г. Северобайкальск в р. Тья в литоральную зону Байкала вместе с речными водами поступает избыточное количество биогенных элементов, что приводит к массовой круглогодичной вегетации чужеродной спирогиры (Timoshkin et al., 2016; 2018). В период открытой воды огромное количество этой нитчатой водоросли выбрасывается на пляжи, перегнивает и смывается в Байкал осенними штормами. Этот фактор, очевидно, является ключевым при загрязнении данной акватории биогенными элементами, в частности нитритами. Более высокие концентрации нитратов, регистрируемые в прибрежных водах на станции зал. Лиственничный, могут быть обусловлены поступлением загрязненных подземных вод (Сутурин и др., 2016; Куликова и др., 2017), а также влиянием вод р. Большая Черемшанка, впадающей в озеро в непосредственной близости от места отбора проб. Другие исследователи

отмечали, что состав вод на участках рек, пролегающих непосредственно в границах поселка, претерпевает значительные изменения – концентрации минеральных форм азота и фосфора в воде рек ближе к устью увеличиваются в несколько раз по сравнению с их содержанием выше поселка и зачастую не соответствуют нормативам качества вод (Мальник и др., 2019). Общеизвестно, что пос. Листвянка является портом приписки для нескольких десятков кораблей и сотен моторных лодок, что также способствует загрязнению акватории сточно-бытовыми отходами. Тем не менее, следует отметить, что концентрации химических компонентов, таких как нитратный, нитритный и аммонийный азот, в озерной воде на всех исследуемых станциях не превышали нормативы качества воды водных объектов рыбохозяйственного значения.

Численность аммонифицирующих бактерий.

Анализ количества аммонифицирующих бактерий (АБ), разлагающих азотсодержащие органические вещества, в пробах воды литоральной зоны оз. Байкал показал значимые различия ($p < 0,05$) между поверхностным и придонным слоями, в 67% проб численность АБ в придонной воде выше, чем в поверхностной. При сравнении численности АБ в водной толще в разные сезоны установлено, что в июне она на порядок выше, чем в сентябре на станциях напротив пос. Листвянка и г. Северобайкальск. В межгодовой динамике отличался 2018 г. ($p < 0,05$). Так, на станциях напротив пос. Большое Голоустное и м. Елохин в поверхностной и придонной воде численность АБ на порядки выше в сентябре 2018 г. (рис. 3). Мы полагаем, что высокая численность АБ на этих станциях обусловлена сильным волнением во время отбора проб в прибрежье, которое привело к взмучиванию донных отложений и увеличению количества доступного органического вещества.

Сравнение численности АБ в водной толще на исследуемых станциях с фоновой показало, что в июне их количество выше на станциях напротив пос. Листвянка ($p < 0,01$), г. Северобайкальск ($p < 0,01$) и пос. Б. Голоустное ($p < 0,05$), в сентябре различий не обнаружено ($p > 0,05$). Максимальные количества АБ

(кл/мл) выявлены в июне 2017 г. на станции г. Северобайкальск в пробах поверхностной и придонной воды – $2,5 \times 10^5$ (SD=0,5) и $6,0 \times 10^5$ (SD=1,8) соответственно (рис. 3). Известно, что столь высокая численность АБ в весенне-летний период (в пределах 10^5) характерна для эвтрофных озер (Zhao et al., 2015). В целом количественные показатели АБ в прибрежных водах озера (10^1 – 10^3) сопоставимы с мезотрофными озерными экосистемами (Воробьева и др., 2012). Средняя численность АБ (кл/мл) в водной толще литоральной зоны озера за трехлетний период исследований в июне составила $5,0 \times 10^2$ (SD=2,8), в сентябре – $6,0 \times 10^2$ (SD=1,3).

В эпилимне высокую численность АБ отмечали на станциях, подверженных интенсивной антропогенной нагрузке: напротив пос. Листвянка, Б. Голоустное, г. Северобайкальск (рис. 3). Максимальные количества АБ (кл/см²) выявлены на станции вблизи г. Северобайкальск – $9,5 \times 10^6$ (SD=1,5; июнь 2017 г.), $2,5 \times 10^6$ (SD=0,5; сентябрь 2018 г.), минимальные – на станции в бух. Пещерка – $4,3 \times 10^3$ (SD=2,2; июнь 2017 г.), $3,5 \times 10^3$ (SD=0,5; июнь 2018 г.). В сезонном аспекте отмечали увеличение численности АБ на порядок в сентябре на станциях бух. Пещерка и м. Елохин. Средняя численность АБ (кл/см²) в эпилимнитных биопленках за трехлетний период исследований в июне была на порядок ниже, чем в сентябре и составляла $3,4 \times 10^4$ (SD=1,2) кл/см² и $2,6 \times 10^5$ (SD=1,4) кл/см² соответственно.

Полученные результаты согласуются с данными более ранних работ, в которых численность бактерий, минерализующих азотсодержащие органические соединения в эпилимне Южного Байкала, колебалась от 10^2 до 10^5 КОЕ/см² (Родина, 1954; Мальник, 2010; Сулова и др., 2018).

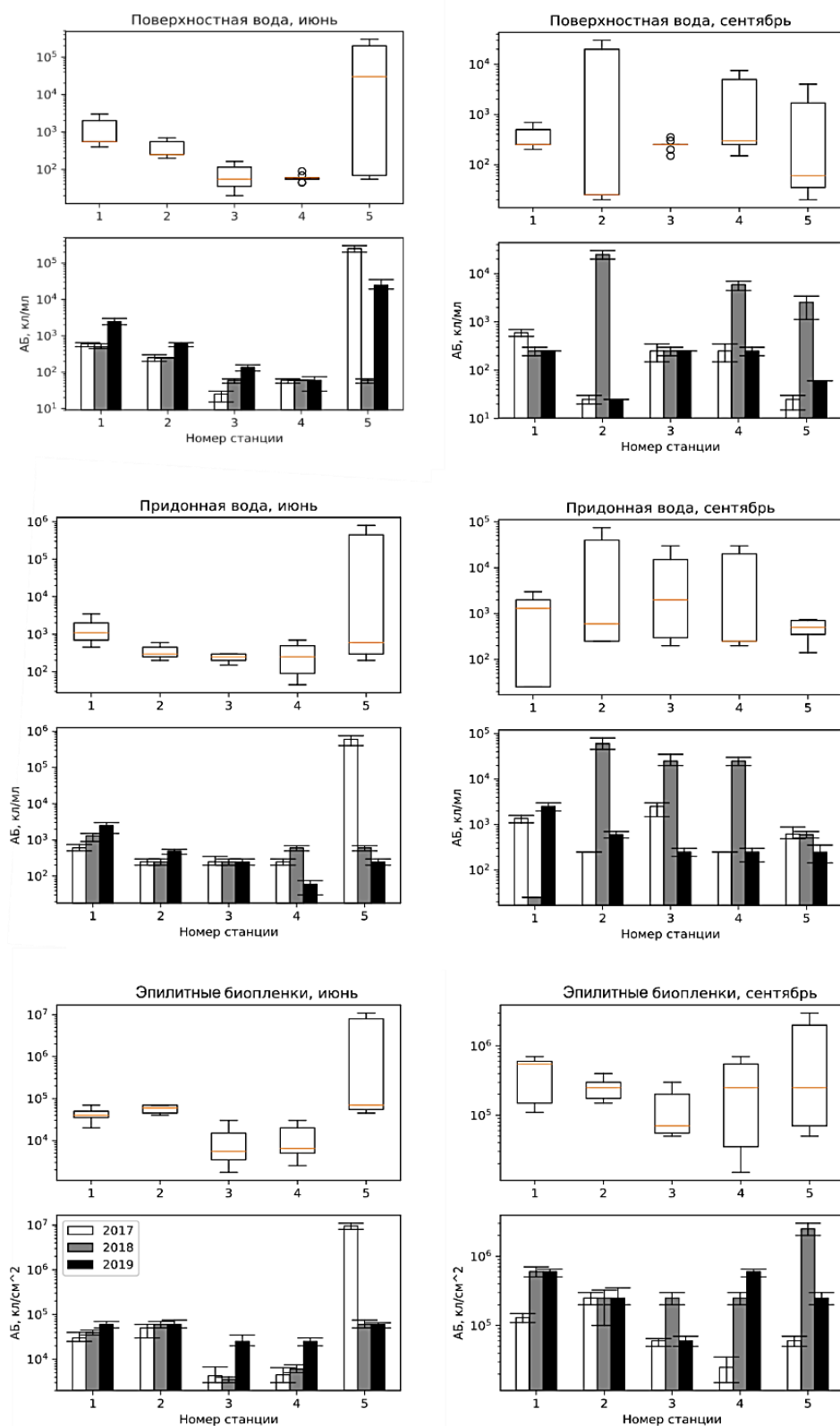


Рисунок 3 – Численность АБ в планктоне и эпилитоне литорали оз. Байкал в июне и сентябре 2017–2019 гг. Станции: 1 – напротив пос. Листвянка, 2 – напротив пос. Б. Голоустное, 3 – в бух. Пещерка, 4 – в районе м. Елохин, 5 – г. Северобайкальск, напротив городского пляжа

Численность денитрифицирующих бактерий.

Благодаря тому, что водная толща оз. Байкал характеризуется высоким содержанием кислорода и низкими концентрациями органического вещества и нитратов, численность ДБ здесь была не высокой на всех станциях – от единиц до десятков кл/мл (рис. 4). Сравнение количества ДБ в поверхностной и придонной воде показало отсутствие значимых различий ($p>0,05$). В разные сезоны (июнь и сентябрь) различия обнаружены в 2019 г. ($p<0,05$) – в июне количество ДБ выше, чем в сентябре. В межгодовой динамике ДБ различий не выявлено ($p>0,05$). Максимальную численность ДБ (кл/мл) определяли на станции в районе пос. Б. Голоустное – 60 (SD=18; июнь 2017 г.), 60 (SD=9; июнь 2018 г.), 60 (SD=18; сентябрь 2018 г.). В сентябре 2019 г. на станции вблизи г. Северобайкальск денитрификаторы в пробах воды не обнаружены. Среднегодовая численность ДБ (кл/мл) в водной толще литоральной зоны озера в июне составила 13 (SD=4), в сентябре – 7 (SD=6).

Вследствие присутствия бескислородных зон и доступного органического вещества в эпилитных биопленках численность ДБ здесь была достаточно высокой, а газообразование интенсивным. Количество ДБ варьировало в зависимости от расположения станций по акватории озера, как в сезонном, так и в межгодовом аспекте (рис. 4). В июне максимальную численность ДБ (кл/см²) в эпилитоне определяли на станциях вблизи г. Северобайкальск – $2,5 \times 10^3$ (SD=0,9; 2017 г.) и в районе м. Елохин – $2,0 \times 10^3$ (SD=0,5; 2017 г.), $1,6 \times 10^3$ (SD=0,2; 2018 г.), $2,5 \times 10^3$ (SD=0,5; 2019 г.). Особо следует рассмотреть станцию в районе м. Елохин, где численность денитрификаторов в эпилитоне весной оставалась высокой на протяжении всего периода исследований. Субстраты с биопленками на данной станции отбирали в прибрежной зоне, расположенной в таежной местности, где происходили крупные пожары (см. выше). Образовавшиеся в результате пожара уголь, зола и другие твердые частицы, содержащие фосфор, неорганический и органический азот (Liao et al., 2013), поступали в озеро весной с талыми водами и после обильных дождей. Древесный уголь с его

большой адсорбционной поверхностью может усиливать нитрификацию, приводящую к повышению уровня нитратов (Zackrisson et al., 1996; Wardle et al., 1998; DeLuca, Sala 2006). Как известно, увеличение концентрации нитратов способствует росту численности ДБ и их метаболической активности (Liao et al., 2013).

Также следует отметить, что в биопленочных обрастаниях на станции напротив м. Елохин в июне 2017 г. нами обнаружены не свойственные для экосистемы Байкала бактерии кандидатного рода *Nitrotoga* (см. подглаву 3.4.5), что в очередной раз свидетельствует о повышенной нитритной нагрузке на данной станции.

В сентябре максимальную численность ДБ (кл/см²) в эпилитоне обнаруживали на станциях в бух. Пещерка – $1,3 \times 10^3$ (SD=0,3; 2017 г.), напротив пос. Б. Голоустное – $1,3 \times 10^3$ (SD=0,3; 2018 г.) и в зал. Лиственничный – $1,3 \times 10^3$ (SD=0,2; 2019 г.), минимальную – на станции в районе м. Елохин – 20 (SD=5; 2018 г.), как показано на рисунке 4. Среднегодовая численность ДБ (кл/см²) за период 2017–2019 гг. в пробах эпилитных биоплёнок в июне составила $7,9 \times 10^2$ (SD=2,4), в сентябре – $4,8 \times 10^2$ (SD=0,5).

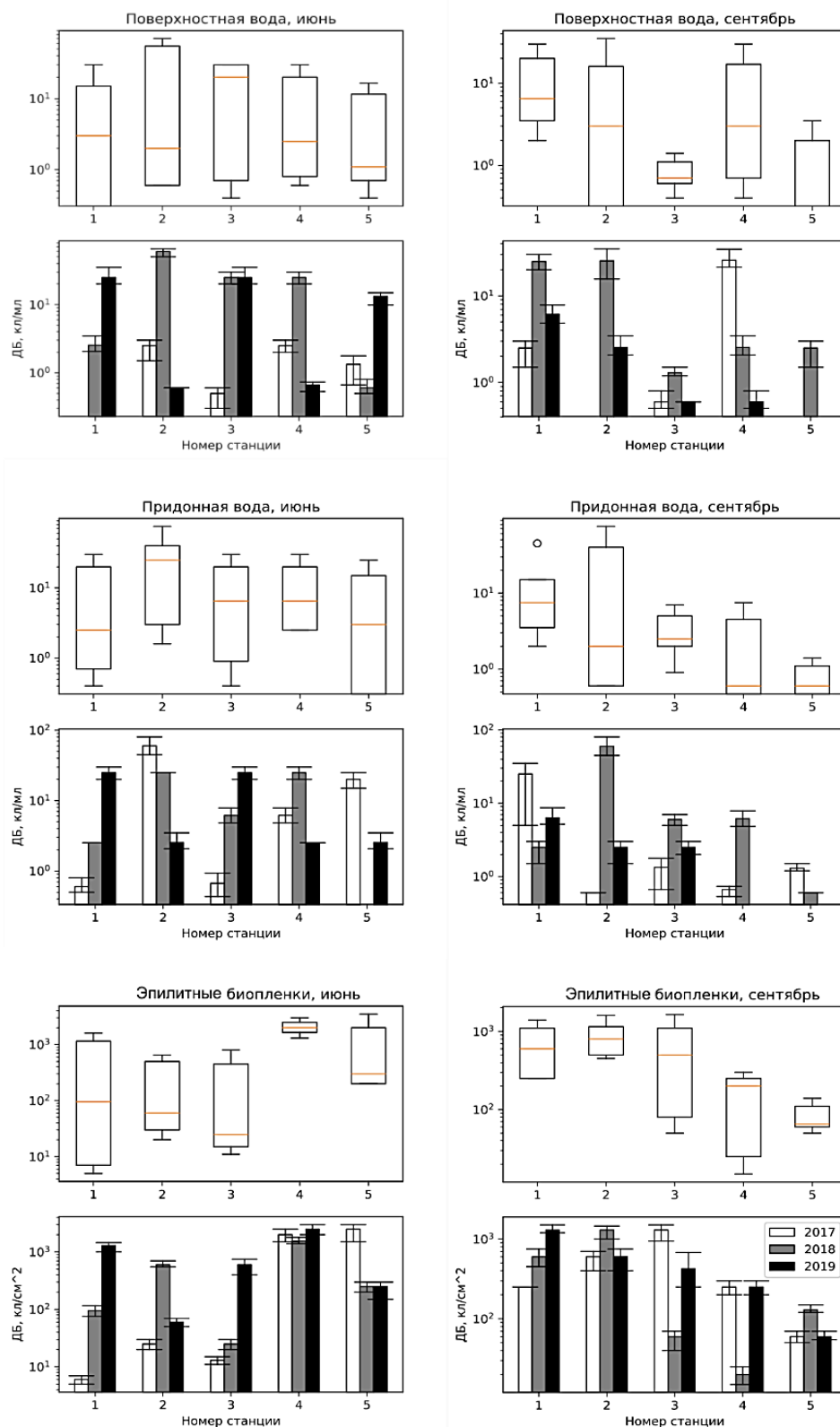


Рисунок 4 – Численность ДБ в планктоне и эпилитоне литорали оз. Байкал в июне и сентябре 2017–2019 гг. Станции: 1 – напротив пос. Листвянка, 2 – напротив пос. Б. Голоустное, 3 – в бух. Пещерка, 4 – в районе м. Елохин, 5 – г. Северобайкальск, напротив городского пляжа

Корреляционный анализ микробиологических и гидрохимических параметров.

Выявлена высокая связь численности АБ и концентрации аммония ($r = 0,77, p=0,05$) в пробах воды на станции м. Елохин. Положительная корреляция, вероятно, обусловлена поступлением в водоем большого количества азотсодержащего органического вещества – субстрата для АБ, продуктом минерализации которого является аммонийный азот. Наблюдаемая корреляция также может быть связана со стимуляцией скорости роста АБ непосредственно высокой концентрацией NH_4^+ (Yang et al., 2007; Zhao et al., 2015).

Показана высокая положительная зависимость количества ДБ с нитратами ($r = 0,75, p=0,05$), а также высокая отрицательная зависимость с нитритами ($r = -0,76, p=0,05$) в пробах воды на станции в бух. Пещерка. Как известно, денитрифицирующие бактерии используют нитраты и нитриты, восстанавливая их до газообразного азота, что объясняет обратную связь между этими параметрами. Положительная корреляция, очевидно, обусловлена поступлением дополнительного количества нитратов, стимулирующих рост и метаболическую активность ДБ (King, Nedwell, 1985). Детальное рассмотрение сезонных и пространственных изменений количества АБ, ДБ и физико-химических параметров среды в ряде озер и водохранилищ северо-востока Китая также продемонстрировало, что количество исследуемых групп бактерий тесно связано с уровнем азотсодержащих веществ. Авторы отмечали сильную корреляционную связь между численностью ДБ и NO_3^- или NO_2^- , как прямого, так и обратного характера (Zhao et al., 2015).

Таким образом, анализ данных по содержанию различных минеральных форм азота и по количеству бактерий, участвующих в их превращении в оз. Байкал, показал, что процессы аммонификации и денитрификации, способствующие самоочищению озера от неорганических и органических азотсодержащих соединений, наиболее активно протекают на станциях,

подверженных антропогенному влиянию. Следует отметить, что в водной толще озера концентрация аммонийного азота остается не высокой из-за потребления его фитопланктоном и окисления в процессе бактериальной нитрификации через нитриты в нитраты. Нитратный азот также детектируется в небольших количествах, так как восстанавливается ДБ до газообразных форм азота. Установлено, что в большинстве случаев численность АБ и ДБ в прибрежных водах оз. Байкал определяли в диапазоне значений, характерных для мезотрофных водоемов. По нашему мнению, необходимо регулярно проводить такие исследования в рамках мониторинга состояния экосистемы Байкала с целью оценки чистоты вод озера и прогноза происходящих изменений.

3.2. Экологические факторы, определяющие пространственное распределение численности денитрифицирующих бактерий эпилимтона в августе 2019 г.

Известно, что эпилимтон активно поглощает различные формы азота и восстанавливает до N_2O и N_2 , что способствует биоремедиации и поддержанию олиготрофных условий в водных экосистемах (Teissier, 2002, 2007, Ribot, 2012, Sanli, 2015, Bernal, 2018). Однако о факторах, определяющих эффективность денитрификации в эпилимтоне, известно не много (Lyautey et al., 2013). В различных местообитаниях наблюдается широкий диапазон физико-химических условий и, вероятно, в разных районах Байкала будет свой ограничивающий фактор или несколько факторов денитрификации.

Для определения экологических факторов, объясняющих различия в количестве денитрифицирующих бактерий литорального эпилимтона оз. Байкал, в августе 2019 г. были отобраны пробы биопленок с каменистых субстратов и придонной воды. Глубина озера в месте отбора проб составляла 10-15 м. Исследовали районы в южной и средней котловинах западного побережья озера: напротив пос. Листвянка, Б. Коты, Б. Голоустное и в прол. Ольхонские Ворота.

Биомасса эпилитных биопленок в исследуемых районах различалась ($p < 0,05$). На станциях напротив пос. Листвянка и в прол. Ольхонские Ворота биомасса биопленок на квадратный сантиметр площади камня была больше по показателям сырого веса, содержание хлорофилла «а» здесь также было выше. Соотношение хлорофилла «а» к сырому весу эпилитной биопленки в среднем составляло $0,017 \pm 0,008\%$. Согласно классификации Lakatos, подобное соотношение указывает на то, что биопленки относятся к гетеротрофному типу (Lakatos, 1991).

Содержание углерода, азота и фосфора в эпилитоне исследуемых станций не различалось, как и молярное соотношение элементов C:P и C:N ($p > 0,05$), однако молярное соотношение азота и фосфора N:P различалось значительно ($p < 0,05$). Минимальное значение соотношения азота к фосфору в биомассе биопленок найдено в районе пос. Листвянка, максимальное в районе прол. Ольхонские Ворота. Такие элементы, как Cr, Zn, Cu, Pb наблюдались в большей концентрации в биопленках у пос. Листвянка.

Общий органический фосфор и азот в пробах нефилтрованной придонной воды на станциях напротив пос. Листвянка и в прол. Ольхонские Ворота были в несколько большей концентрации, чем напротив пос. Б. Коты и пос. Б. Голоустное. Концентрации нитратного азота в придонной воде на всех станциях были близки между собой, но значительно отличались от станции в прол. Ольхонские Ворота. Температура придонного слоя воды на станциях напротив пос. Листвянка и пос. Б. Коты была ниже, чем в районе пос. Б. Голоустное и прол. Ольхонские Ворота (табл. 4).

Молярное соотношение общего азота к общему фосфору в придонной воде имело такой же тренд, как и соотношение этих элементов в эпилитных биопленках. Наименьшее значение $N_{общ}:P_{общ}$ выявлено у пос. Листвянка и составило 15, напротив пос. Б. Коты – 20, напротив пос. Б. Голоустное – 24 и в прол. Ольхонские Ворота – 19. В биомассе биопленок молярное соотношение азота к фосфору в среднем составило 12, 17, 32 и 29 соответственно.

Таблица 4 – Гидрохимические характеристики придонной воды в месте отбора каменистых субстратов, средние концентрации хлорофилла «а» и основных элементов в эпилитных биопленках

Показатель	Напротив пос. Листвянка	Напротив пос. Б. Коты	Напротив пос. Б. Голоустное	Прол. Ольхонские Ворота
Придонный слой воды, мг/л				
N[NO ₃ ⁻]	0,06	0,07	0,04	0,01
N[NH ₄ ⁺]	0,007	0,003	0,005	0,001
N[NO ₂ ⁻]	0,001	0,000	0,001	0,001
P[PO ₄ ³⁻]	0,004	0,005	0,003	0,002
P общий	0,012	0,008	0,007	0,012
C общий	5,3	5,4	3,7	3,6
N общий	0,183	0,163	0,173	0,235
Температура, °С	7	6	12	13
Эпилитные биопленки				
Хлорофилл ¹ «а», (мкг/см ²)	34	27	14	42
Хлорофилл ¹ «а», (мкг/г)	339	446	443	370
Сырой вес ¹ , г/см ²	0,25	0,07	0,05	0,30
C, мг/см ²	8,22	4,3	2,67	9,77
N, мг/см ²	0,99	0,62	0,48	1,00
P, мг/см ²	0,150	0,082	0,026	0,050
∑ Cd, Zn, Cu, Ni, Cr, Co, As, Pb ² , мг/кг	346	180	207	70
Денитрифицирующие бактерии ¹	<u>3,0</u>	<u>2,5</u>	<u>4,0</u>	<u>4,7</u>
<u>log10/г сырого веса</u> <u>log10/см²</u>	2,4	1,9	3,0	4,5

Примечание. ¹ – среднее, ² – медиана.

Количество культивируемых денитрифицирующих бактерий в биопленках исследуемых районов различалось как по наиболее вероятному числу клеток на площадь в 1 см², так и при пересчете на грамм влажного веса

биоленки ($p < 0,05$). Наибольших значений численность достигала в прол. Ольхонские Ворота – 6×10^4 кл/см², что составляло максимальное значение для эпилитных биопленок оз. Байкал. Минимальные значения выявлены на станции у пос. Б. Коты – 6 кл/см². Между биомассой биоленки и количеством денитрификаторов значимой связи не выявлено.

Выявлено, что количество денитрифицирующих бактерий в биопленках наиболее тесно связано с температурой и концентрацией общего азота в придонном слое воды ($r = 0,6$ и $0,7$ соответственно, $p = 0,05$).

Между количеством денитрификаторов на грамм сырого веса биоленки и средними значениями стехиометрии N:P также обнаружена высокая корреляционная связь ($r = 0,7$, $p = 0,05$) – большее количество денитрификаторов приурочено к биопленкам с более высоким стехиометрическим соотношением азота и фосфора.

О связи стехиометрии биопленок и биогеохимических циклах бактерий известно немного. 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).

В биопленках на станциях напротив пос. Б. Голоустное и прол. Ольхонские Ворота выявлено 4,0 и 4,7 log₁₀ кл/г денитрификаторов и молярное соотношение азота к фосфору равное 30 и 21 соответственно. В биопленках станций напротив пос. Листвянка и пос. Б. Коты – 3,0 и 2,5 log₁₀ кл/г денитрификаторов и молярное соотношение азота и фосфора – 12 и 17 соответственно (рис. 5) Ранее 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 – на дефицит фосфора. В условиях дефицита азота и фосфора как по отдельности, так и совместно наблюдалось снижение скорости роста перифитонного мата (Hillebrand, Sommer, 1999).

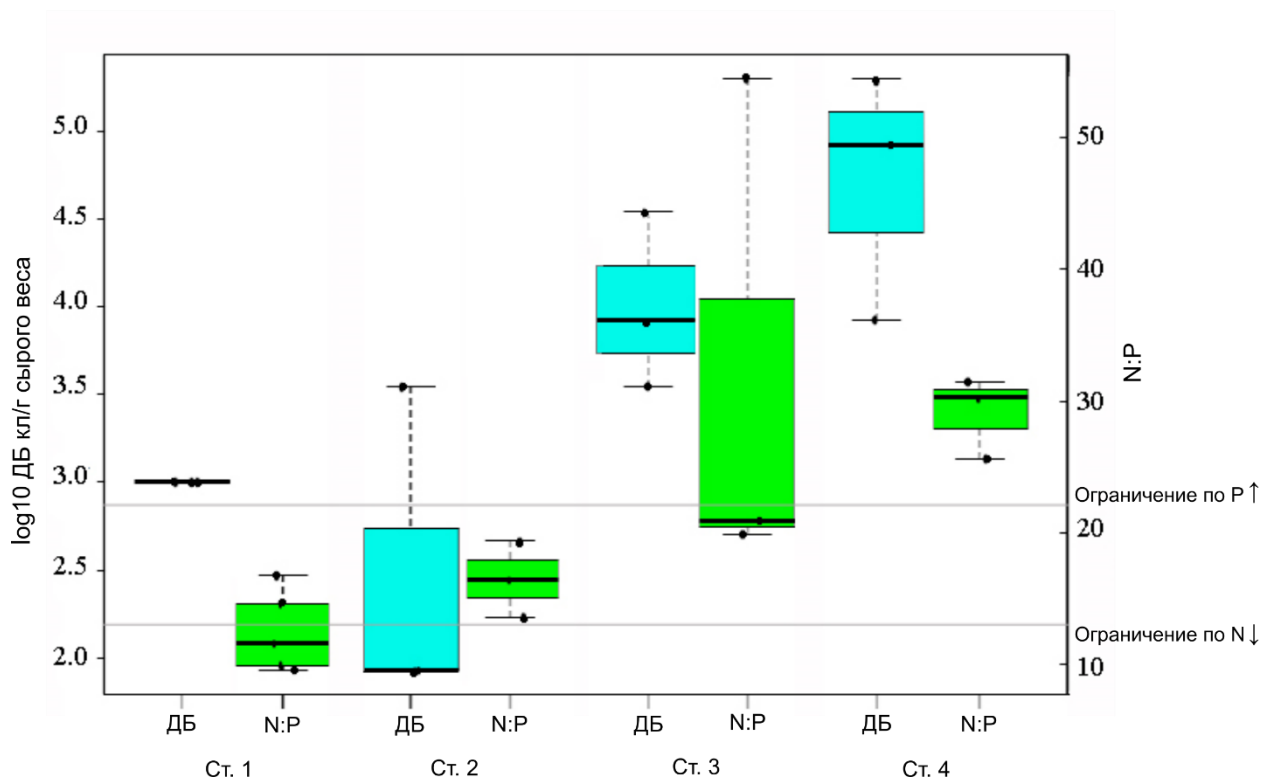


Рисунок 5 – Распределение денитрифицирующих бактерий (ДБ) кл/г сырого веса и стехиометрического соотношения N:P на станциях исследования: Ст. 1 – напротив пос. Листвянка, Ст. 2 – напротив пос. Б. Коты, Ст. 3 – напротив пос. Б. Голоустное, Ст. 4 – прол. Ольхонские Ворота. Боксплоты охватывают 2 и 3 квантили, линия посередине – медиана. «Усы» – максимальные и минимальные значения.

В 2015 г. в районе пос. Листвянка и Б. Коты проведены эксперименты с использованием субстратов, рассеивающих различные концентрации неорганических питательных веществ (Ozersky et al., 2017). Стимуляция только фосфором не давала значимого прироста фитобентоса, определяемого по содержанию хлорофилла и количеству клеток водорослей. Гораздо заметнее рост стимулировал азот, а значительное увеличение биомассы получено при совместном стимулировании азотом и фосфором. Это говорит о том, что продукция фитобентоса в данном районе литорали Байкала ограничена дефицитом азота, а не фосфора. Наши наблюдения стехиометрии азота и фосфора эпилитных биопленок согласуются с полученными ранее и

пять из девяти образцов эпилимниона этого района показали дефицит азота согласно классификации, предложенной Н. Hillebrand и U. Sommer (1999).

Таким образом, денитрифицирующие бактерии более распространены в эпилимниальных биопленках, не испытывающих дефицит азота, определенный по стехиометрическому соотношению азота и фосфора в биомассе эпилимниального сообщества.

Положительной взаимосвязи между количеством денитрифицирующих бактерий эпилимниальных биопленок и концентрацией нитратного азота в придонной воде не выявлено. Возможным поставщиком нитратов в эпилимниальной биопленке может быть нитрификация – сопряженный процесс (Teissier et al., 2002). Отсутствие связи между количеством генов *nirK*, *nirS* и параметрами окружающей среды, в том числе концентрацией NO_3^- , наблюдали для эпилимниальных биопленок высокогорных олиготрофных озер. В то же время обилие генов *nirK* и *nirS* в эпилимниальной биопленке положительно коррелировало с обилием бактериального и архейного гена *amoA*, что указывало на сопряженность денитрификации и нитрификации (Vila-Costa et al., 2014).

Известно, что наиболее важными факторами, влияющими на сообщества денитрификаторов, являются соленость, концентрация растворенного кислорода, органического углерода (донор электронов), содержание общего азота, в частности нитратов и нитритов (акцептор электронов) (Saarenheimo et al., 2015; Álvarez-Cobelas et al., 2019; Ming et al., 2021). К более редко учитываемым факторам можно отнести, например, содержание тяжелых металлов (Deng et al. 2018). Так, выявлено, 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 эпилимниальных биопленках в среднем

составила около 70 мг/кг и не показала значимой отрицательной корреляции с численностью 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 в эпилитных биопленках оз. Байкал на численность денитрифицирующих бактерий.

Таким образом, 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 связь между этими факторами и денитрификаторами. Из четырех исследуемых районов литорали Байкала, наибольший потенциал денитрификации наблюдался на станции в прол. Ольхонские Ворота и, вероятно, отражал высокую интенсивность денитрификации. Район пос. Листвянка считается самым «экологически неблагополучным», что выражается в массовом развитии нетипичного 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 прол. 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.

ГЛАВА 4. ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ БАКТЕРИЙ КРУГОВОРОТА АЗОТА В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ОЗ. БАЙКАЛ

4.1. Культивируемые денитрифицирующие бактерии в эпилитных био пленках

Денитрификация осуществляется разнообразными в таксономическом отношении бактериями, но, главным образом, представителям фило *Proteobacteria* (Zumft, 1997).

Из биопленок, отобранных с поверхности камней на станциях вблизи пос. Листвянка, пос. Б. Голоустное, г. Северобайкальск и в районе Ушканьих Островов (о-в Тонкий, бух. Северная, бух. Пещерка), на среде Гильтая выделены чистые культуры денитрифицирующих бактерий, восстанавливающие нитраты до газообразных соединений азота – 30 штаммов. Для морфологически различных штаммов (табл. 5), изолированных на разных станциях, охарактеризованы физиолого-биохимические свойства и проведена идентификация на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК и *nirS*.

Таблица 5 – Физиолого-биохимические свойства чистых культур денитрифицирующих бактерий

Штамм	Станция отбора проб биоплёнок	Фосфатаза	Амилаза	Лецитиназа	Протеаза	
					к	ж
1СБ	г. Северобайкальск	+	0	0	0	0
11СБ	г. Северобайкальск	-	0	8	22	30
1МУ	о-в Тонкий	-	0	0	0	0
4БУС	бух. Северная	-	0	0	22	29
1БУП	бух. Пещерка	-	0	0	0	0
5Г	пос. Б. Голоустное	+	12	10	29	26
БП2-2	пос. Листвянка	-	1	10	28	40

Примечание. Амилолитическую, протеолитическую, лецитиназную активности учитывали по диаметру зоны просветления вокруг колонии в мм; протеаза (к) – субстрат казеин, протеаза (ж) – субстрат желатин. Активность щелочной фосфатазы оценивали по наличию (+) или отсутствию реакции (-).

Все культуры представлены подвижными, грамотрицательными, оксидазоположительными, не образующими спор палочками, продуцирующими каталазу. Способность к протеолизу казеина и желатина обнаружена у 4 культур, к гидролизу крахмала у 2 штаммов. Наличие щелочной фосфатазы выявлено у 2 культур. Лецитиназу (фактор патогенности) продуцировали 3 штамма, изолированные в районах с высокой антропогенной нагрузкой.

По результатам BLAST-анализа фрагмента гена 16S рНК все штаммы гомологичны представителям рода *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). Определено 2 фило типа: 1SB, обнаруженный в пробах на станции в районе г. Северобайкальск (штамм 1СБ) и 11SB, который встречался на всех исследуемых станциях (штаммы 11СБ, 1МУ, 4БУС, 1БУП, 5Г и БП2-2). Более подробный филогенетический анализ показал, что фило тип 11SB идентичен штаммам *Pseudomonas gessardii*, изолированным из воды оз. Чандра Тал и осадков оз. Сурадж Тал, а также типовому штамму *Pseudomonas gessardii* CIP 105469 из минеральных вод (Verhille et al., 1999). Фило тип 1SB формирует на дереве совместный кластер с типовым штаммом *Pseudomonas veronii* CIP 104663 (рис. 6).

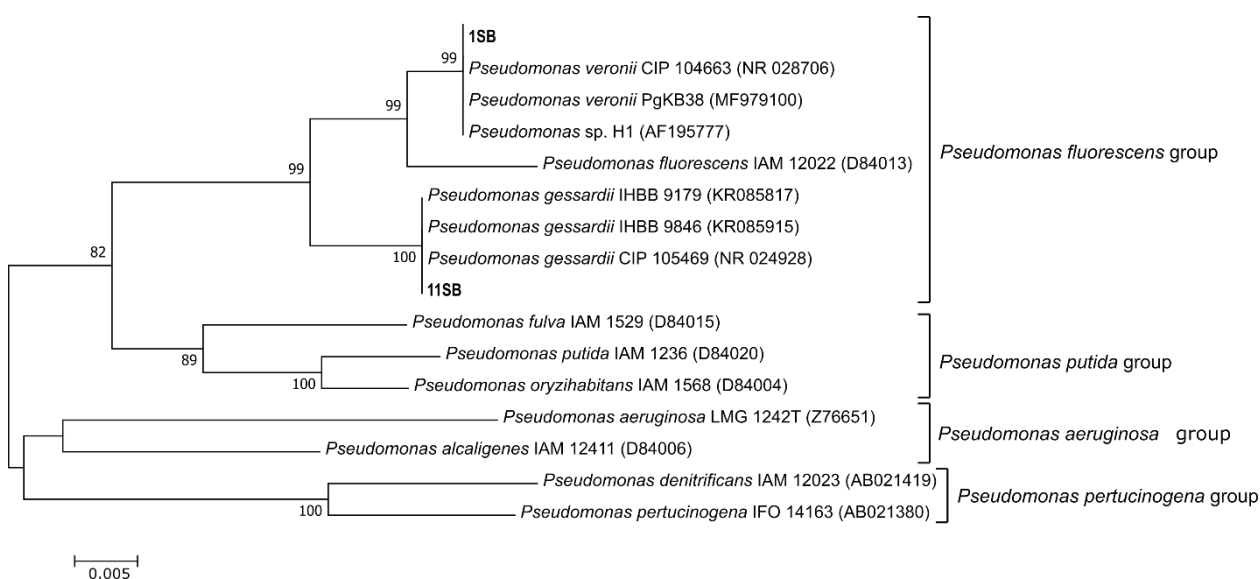


Рисунок 6 – Филогенетическое древо, построенное по фрагментам гена 16S рНК для представителей рода *Pseudomonas*. Последовательности штаммов,

полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Бутстреп-анализ проведен для 1000 реплик

Способность изолятов к денитрификации была подтверждена с помощью амплификации генов (*nirS*, *nirK*), кодирующих нитритредуктазу. Во всех культурах обнаружен ген *nirS*. BLAST-анализ аминокислотных последовательностей гена *nirS* показал, что филотип 1SB (штамм 1СБ) наиболее сходен с *Pseudomonas veronii* (WP_017849350) и псевдомонадами из почвы. Филотип 11SB (штаммы 11СБ, 1МУ, 4БУС, 1БУП, 5Г и БП2-2) гомологичен *Pseudomonas gessardii* (WP_076963273) и штаммам из почвы (Braker et al., 2010) и осадков устья р. Колн (Nogales et al., 2002) (рис. 7).

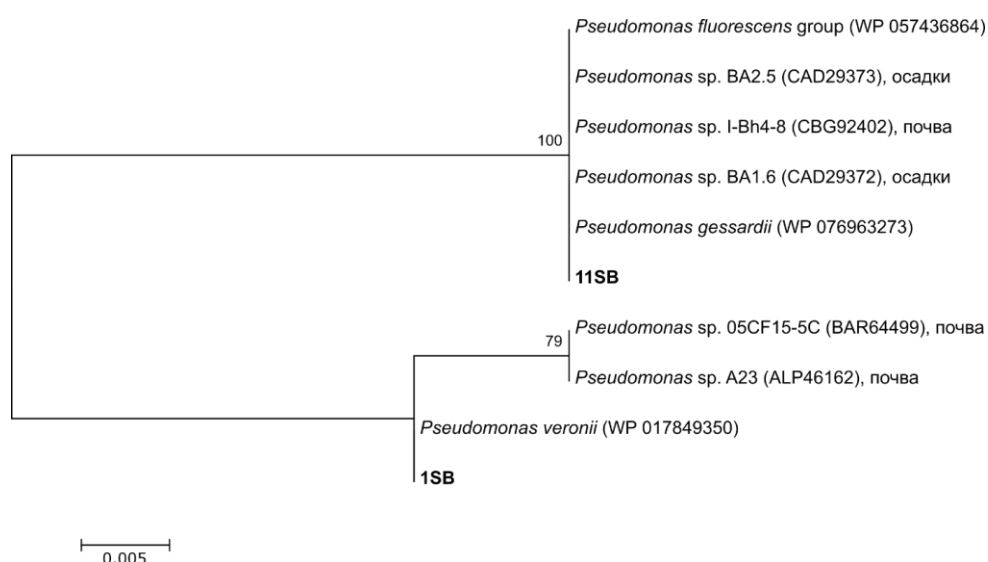


Рисунок 7 – Древо аминокислотных последовательностей гена *nirS*, построенное методом максимального правдоподобия. Последовательности штаммов, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом.

Бутстреп-анализ проведен для 100 реплик

Для штамма *Pseudomonas* sp. 1СБ секвенирован геном и с использованием базы данных Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) найдены интересующие участки метаболизм азота (рис. 8). Геном бактерии включает гены, кодирующие ферменты, необходимые для

осуществления полного процесса денитрификации. Это гены *narG*, *nirS*, *norB*, *nosZ*, кодирующие нитрат-, нитрит-, NO- и N₂O-редуктазы. Также представлены гены, ответственные за диссимиляционное восстановление нитрата до аммония (*nirBD*). Нитрат транспортируется в клетку переносчиком, кодируемым генами *nrtABCD*. Это нитрат-нитритный переносчик, который транспортирует и нитрат, и нитрит с высоким сродством (Makiko et al., 2006).

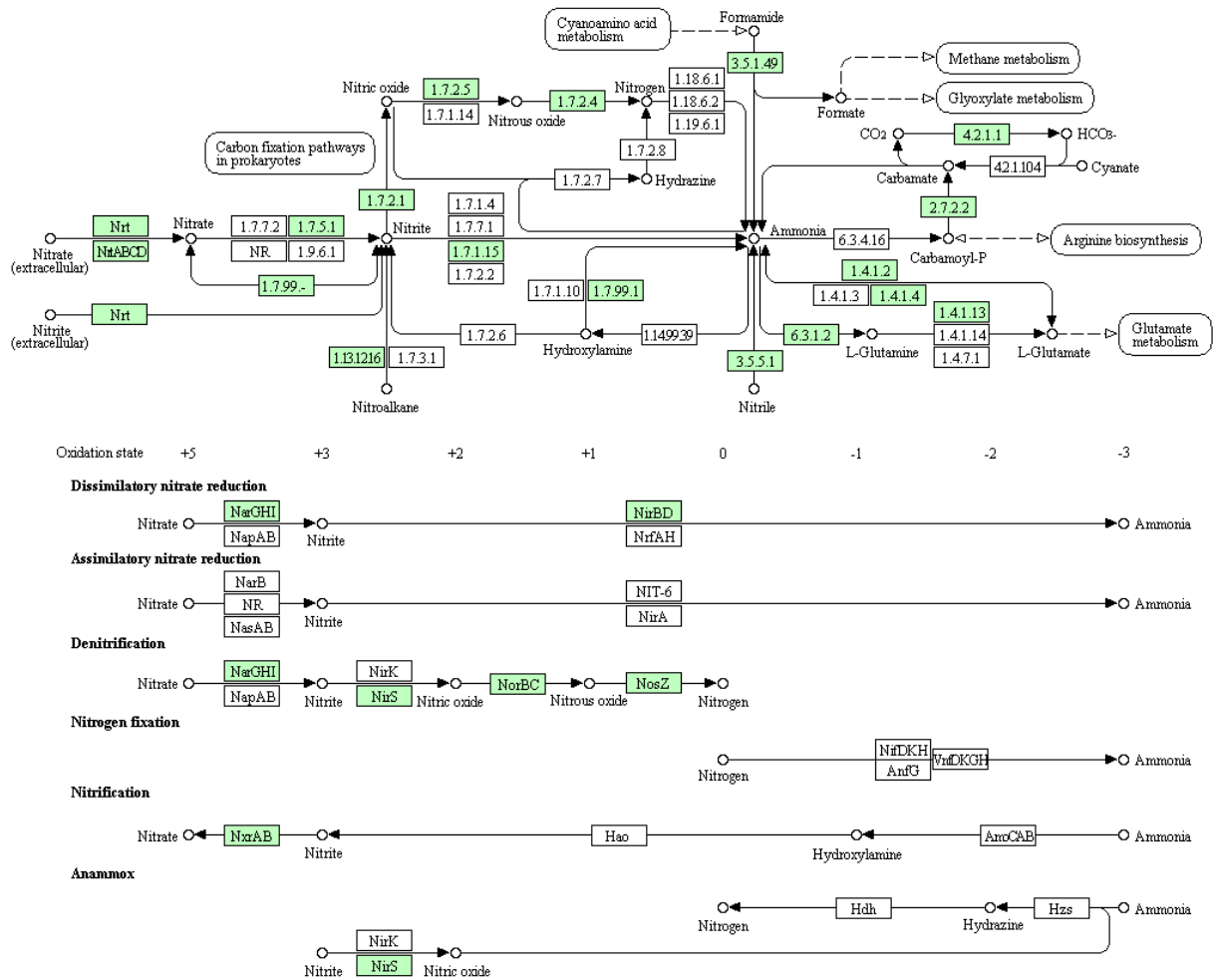


Рисунок 8 – Метаболический путь азота у *Pseudomonas* sp. 1CB, определенный с помощью базы данных KEGG

По данным разных исследований, наиболее распространенными культивируемыми денитрификаторами в природных условиях являются гетеротрофные бактерии родов *Pseudomonas* и *Alcaligenes* (Knowles, 1982).

Так, из различных сред обитания (почвы, озерные отложения, птичий помет) на нитратном агаре выделено 1500 изолятов, из них только 250 продуцировали газ (N_2 , небольшое количество N_2O). В процессе дальнейшего лабораторного культивирования некоторые штаммы утратили жизнеспособность, некоторые способность к газообразованию и восстанавливали нитрат только до нитрита. В конечном итоге, 146 денитрифицирующих изолятов были охарактеризованы: большая часть идентифицированы как *Pseudomonas fluorescens* и *Alcaligenes*, другие штаммы определены как *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Flavobacterium*. В исследовании не было выделено ни одного организма, который был бы схож с наиболее изученными видами денитрификаторов: *Pseudomonas denitrificans*, *Paracoccus denitrificans* (Gamble et al., 1977).

Доминирование псевдомонад в популяциях денитрифицирующих бактерий характерно для некоторых водоемов. Так, в оз. Кизаки (Япония) из 44 выделенных штаммов денитрифицирующих бактерий большинство (34 штамма) отнесено к роду *Pseudomonas* (Terai, 1979). В водной толще оз. Байкал представители рода *Pseudomonas* составляют в среднем 80% от всех культивируемых гетеротрофов. Наибольшее их количество зарегистрировано в литоральной зоне озера вблизи населенных пунктов (Павлова и др., 2003).

Таким образом, в результате исследований показано доминирование бактерий рода *Pseudomonas* среди культивируемых денитрификаторов в биопленках, сформированных на каменистых субстратах в литоральной зоне оз. Байкал.

4.2. Некультивируемые денитрифицирующие бактерии в эпилитных биопленках, определенные методом клонирования

Для выявления разнообразия денитрифицирующих бактерий в эпилитоне оз. Байкал с помощью маркеров к гену *nirK*, кодирующему медьсодержащую нитритредуктазу, пробы биопленок были отобраны с поверхности камней в прибрежной зоне в 2017 г. Образцы G7 и G8 подняты с

глубины 1 м на станции в районе пос. Листвянка в июне и сентябре соответственно; G9 и G10 – с глубины 1 м в районе г. Северобайкальск в июне и сентябре соответственно; G5 и G6 – отобраны водолазной группой с глубины 15 м в августе на станциях вблизи пос. Б. Голоустное и в районе бух. Ая соответственно.

Всего проанализировано 170 аминокислотных последовательностей гена *nirK*, сгруппированных в 35 ОТЕ (табл. 6).

BLAST-анализ показал, что для всех клонированных последовательностей ближайшими родственниками со сходством от 78 до 100% являлись преимущественно некультивируемые денитрифицирующие бактерии из разных местообитаний. Только две последовательности пробы G8 были идентичны с таковыми штамма *Ochrobactrum* sp. ЗСВ4. Наибольшим видовым богатством, согласно индексам разнообразия, отличались образцы G5 (пос. Б. Голоустное), G9 и G10 (г. Северобайкальск); наименьшим – проба G8 (пос. Листвянка) (табл. 6).

Таблица 6 – Богатство и разнообразие последовательностей гена *nirK* в биопленках литорали оз. Байкал

Образец	Количество последовательностей	Количество ОТЕ	Покрытие, (%)	Индексы разнообразия			
				ACE	Chao1	Шеннона	Обратный Симпсона
G5	19	10	63,2	24,2	31,0	2,06	6,33
G6	42	7	90,5	19,5	10,0	1,12	2,16
G7	25	8	84,0	14,3	10,0	1,59	3,45
G8	31	6	90,3	9,7	7,5	0,96	1,76
G9	32	11	75,0	31,0	20,3	1,51	2,46
G10	21	10	85,7	11,7	10,6	2,20	8,32

Состав последовательностей гена *nirK* и их относительное обилие различались между пробами с разных станций. ОТЕ 1, включающая наибольшее количество последовательностей (90), доминировала во всех образцах биопленок, кроме G5, где преобладала ОТЕ 2. ОТЕ 2, содержащая 14 последовательностей, также найдена во всех образцах за исключением G8. Кроме того, ещё 7 ОТЕ обнаружены более чем в одном образце, а 25 ОТЕ

только в одной пробе, 18 из которых были представлены единичной последовательностью гена *nirK* (Рисунок 9).

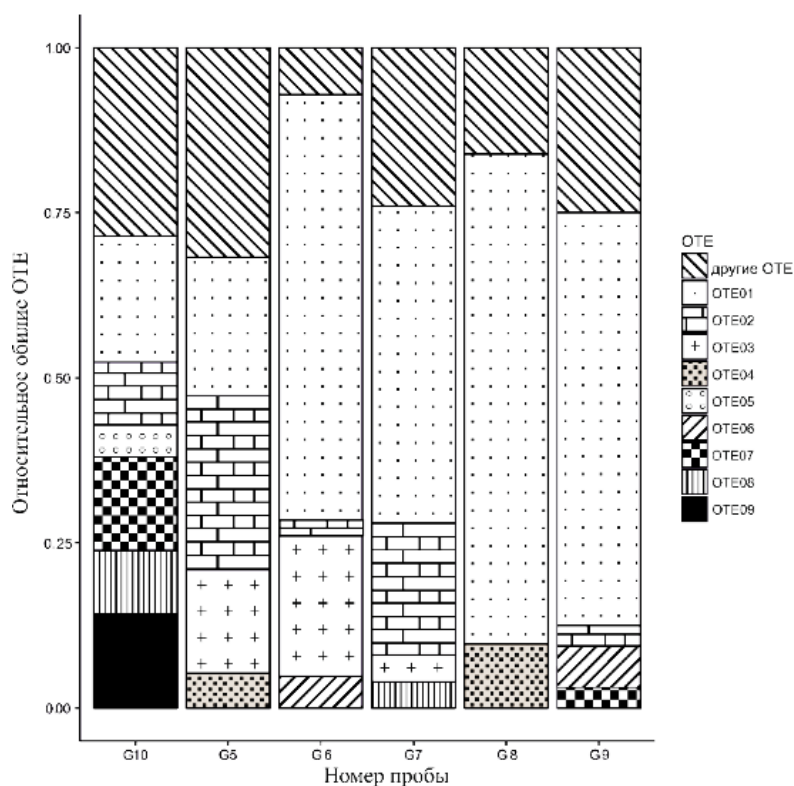


Рисунок 9 – Относительное обилие ОТЕ в образцах биопленок G5, G6, G7, G8, G9, G10

Древо последовательностей всех проб биопленок, сгруппированных в 35 ОТЕ, и родственных последовательностей из GenBank демонстрирует, что клонированные последовательности фрагмента гена *nirK* распределились в четыре кластера (рис. 10).

Кластер I содержит ОТЕ с низким сходством с последовательностями из GenBank. Так, ОТЕ 7, 19, 23, 24, 27, 28 и 32 на 78, 93, 90, 82, 89, 87 и 93%, соответственно, сходны с последовательностями из устья Желтой реки, оз. Плюсеее и почвы. Большая же часть последовательностей (151) объединилась в кластер IV: 79% из образца G5, 98% – G6, 84% – G7, 97% – G8, 94% – G9 и 67% – G10. Ближайшими родственниками для данных последовательностей были штаммы порядков *Rhodobacterales* и *Hyphomicrobiales* (*Rhizobiales*) и

некультивируемые бактерии из различных местообитаний: биопленки олиготрофных озер в Пиренеях (Vila-Costa et al., 2014), прибрежные микробные маты, вода-осадки мезотрофного оз. Шохзее и водная толща эвтрофного оз. Плюсзее (Kim et al., 2011), осадки эвтрофных озер Дунху (Hou et al., 2013) и Геху, водная толща (Li et al., 2014) и осадки устья Желтой реки, активный ил, почва. Очевидно, что столь широко распространенная группа бактерий играет весьма важную роль в осуществлении процесса денитрификации.

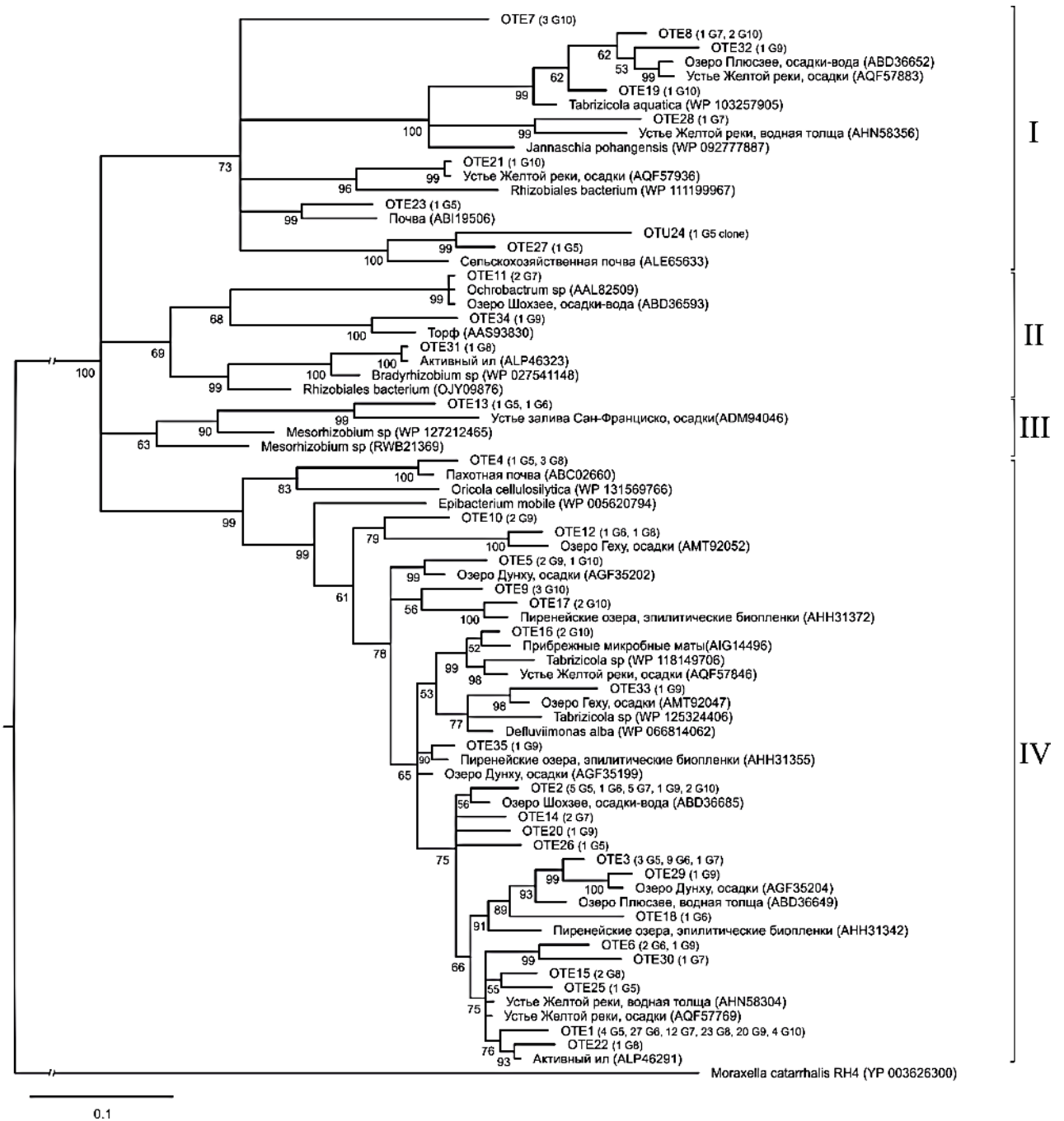


Рисунок 10 – Древо, построенное на основе аминокислотных последовательностей гена *nirK*, сгруппированных в ОТЕ. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью bootstrap-анализа 20 млн. альтернативных деревьев. В качестве внешней группы использовали последовательность гена *aniA*, кодирующую нитритредуктазу в *Moraxella catarrhalis* (YP_003626300)

Полученные нами результаты согласуются с данными исследования разнообразия денитрификаторов в других озерах. Так, большинство

последовательностей гена *nirK* из эпипитных биопленок олиготрофных озер в Пиренеях отнесены к порядкам *Hyphomicrobiales* и *Rhodobacterales* класса *Alphaproteobacteria* (Vila-Costa et al., 2014). Для осадков бореальных озер, расположенных в Финляндии, также показано, что основная доля последовательностей гена *nirK* принадлежит бактериям порядка *Rhizobiales* (Saarenheimo et al., 2015).

Предположительно, в биопленках оз. Байкал гены *nirK*-типа содержат не только *Alphaproteobacteria*, но и представители других филумов и классов. В последние годы на основе анализа полных геномов бактерий установлено, что гены *nirK* присутствуют в филах *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* и т.д., при этом показано разделение последовательностей на две клады: первая в основном включает *Alphaproteobacteria* (и некоторые *Gamma*- и *Betaproteobacteria*), вторая содержит более разнообразные таксоны (Helen et al., 2016).

Иерархический кластерный анализ сообществ денитрификаторов из различных сред обитания демонстрирует формирование отдельных групп последовательностей в зависимости от физико-химических параметров окружающей среды (рис. 11). Байкальские последовательности группируются в отдельный кластер с последовательностями из воды, осадков и биопленок других озёр. Следует отметить, что последовательности из проб, отобранных с глубины 1 м в акваториях пос. Листвянка и г. Северобайкальск, объединились в один подкластер с последовательностями мезотрофных и эвтрофных озер. Выявленный факт может отражать последствия избыточного поступления биогенов в прибрежную зону озера, которые особенно ярко выражены на небольших глубинах вблизи населенных пунктов (Timoshkin et al., 2018).

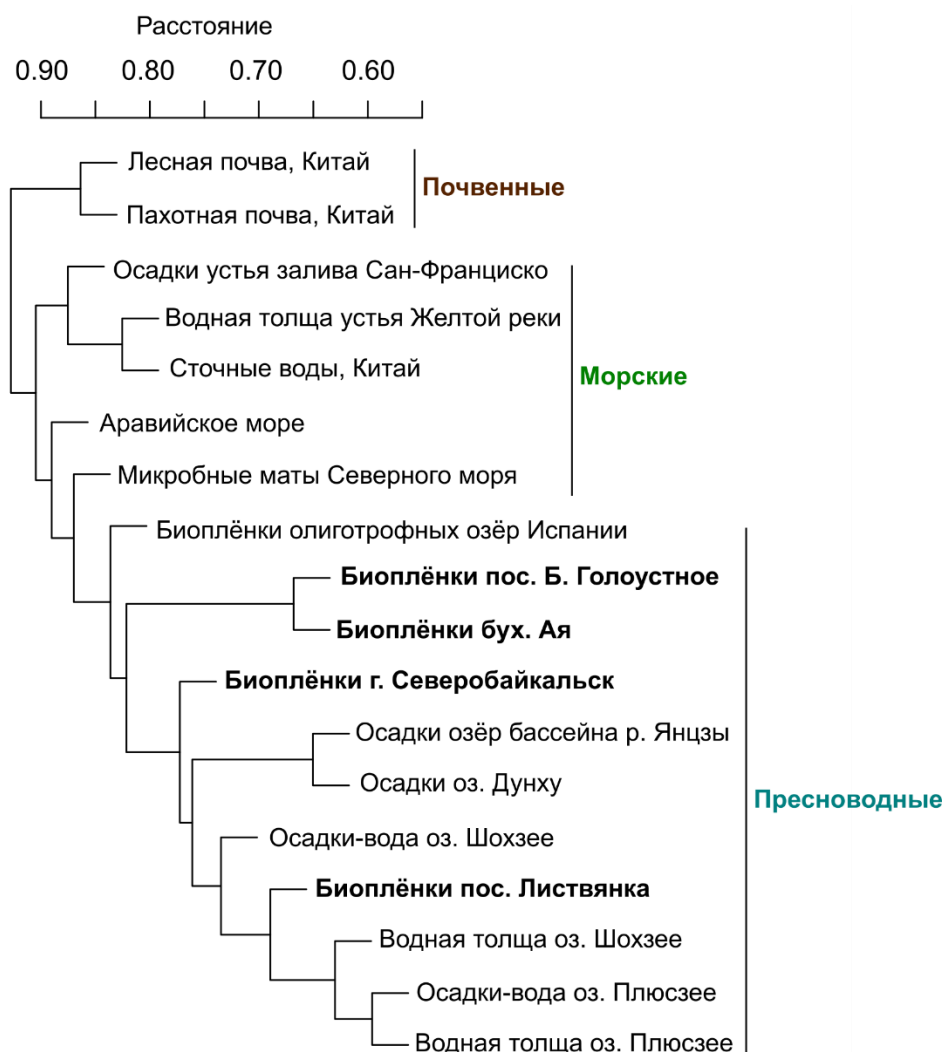


Рисунок 11 – Дендрограмма *nirK*-сообществ, построенная с использованием иерархического кластерного анализа (hclust) методом UPGMA. Сообщества денитрификаторов из оз. Байкал выделены жирным шрифтом

4.3. Анализ разнообразия микробных сообществ водной толщи, поверхностного микрослоя воды и эпилитных биопленок по генам 16S рРНК, *nirK* и *nirS* методом высокопроизводительного секвенирования

С помощью метода высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК и функциональных генов *nirK* и *nirS* исследованы состав и разнообразие микробных сообществ, населяющих биопленки каменистых субстратов, поверхностный микрослой воды, водную толщу и придонную воду в Южном Байкале. Пробы для исследования отбирали в августе 2019 г. на станциях напротив пос. Б. Коты и Б. Голоустное.

Физико-химические параметры исследуемых проб воды и эпилитона представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7 – Физико-химические параметры проб воды

Станция	Биотоп, образец	Т, °С	ТОС	ТР	ТN	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻
Напротив пос. Б. Коты	Поверхностный микрослой, ВК1	13,7	35,3	0,023	0,206	0,013	0,003	0,08	0,023
	Водная толща, ВК2	10	5,8	0,007	0,132	0,002	0,001	0,08	0,008
	Придонная вода, ВК4	6	5,4	0,008	0,163	0,004	0,001	0,29	0,016
Напротив пос. Б. Голоустрое	Поверхностный микрослой, G1	15,5	3,1	0,015	0,160	0,009	0,001	0,12	0,018
	Водная толща, G2	14	3,8	0,007	0,120	0,004	0,002	0,12	0,007
	Придонная вода, G4	12	3,7	0,007	0,173	0,007	0,002	0,17	0,009

Таблица 8 – Химические параметры проб эпилитона

Станция	Биотоп, образец	ТОС	ТР	ТN
Напротив пос. Б. Коты	Эпилитные биоплёнки, ВК51 + ВК53	4,2	0,053	0,6
Напротив пос. Б. Голоустрое	Эпилитные биоплёнки, G51 + G52	2,7	0,024	0,4

Общее разнообразие по гену 16S рРНК

Получено 169 497 последовательностей из 9 образцов со средней длиной 418 пар оснований. Филотипы выделяли при кластерном расстоянии 0,03 – всего 810 ОТЕ.

Кривые накопления видов (рис. 12), а также значения покрытия от 99.9 до 100 %, свидетельствовали о том, что полученных данных достаточно для полной характеристики разнообразия сообществ. Согласно кривым разрежения и индексам видового богатства (Chao1) и разнообразия (индекс Шеннона), более разнообразным является сообщество водной толщи на станции напротив пос. Б. Коты (ВК2), наименее – поверхностного микрослоя воды на станции напротив пос. Б. Голоустрое (G1).

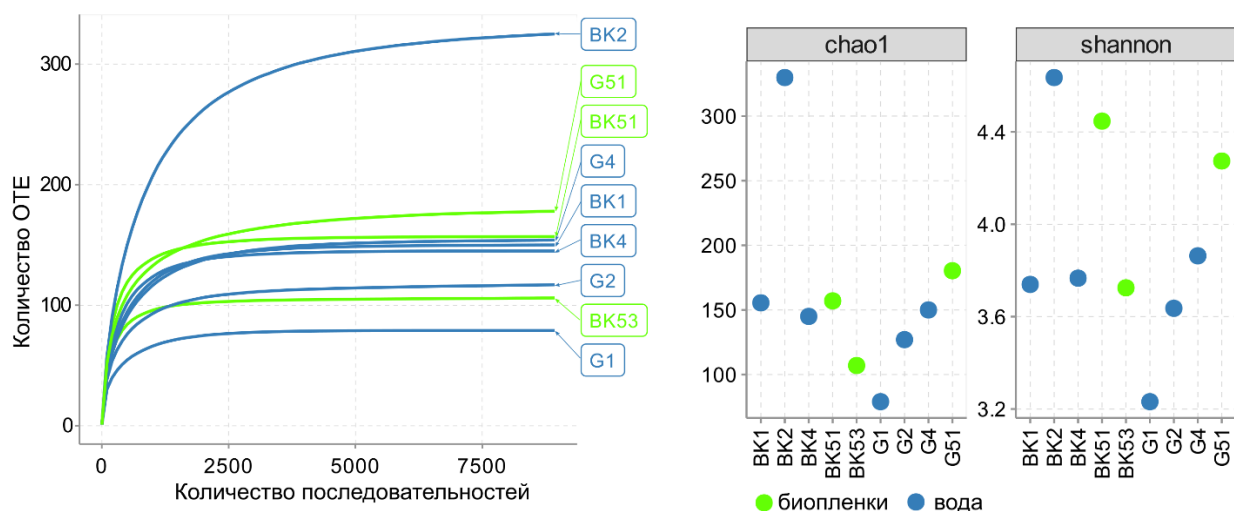


Рисунок 12 – Кривые накопления видов (генетическая дистанция 0,03) и индексы разнообразия для образцов микробных сообществ планктона (BK2, BK4, G2, G4), нейстона (BK1, G1) и эпилитона (BK51, BK53, G51). Образцы станций напротив пос. Б. Коты (BK) и напротив пос. Б. Голоустное (G).

В изученных бактериальных сообществах к доминирующим филам отнесены *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*. Они содержали не менее 1% от общего числа последовательностей в каждом микробном сообществе. Однако микробиомы эпилитных биопленок сильно отличались от поверхностного микрослоя и водной толщи по представленности доминирующих крупных таксонов. Так, в эпилитоне выявлено значительно больше представителей *Alphaproteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria*. В воде, включая поверхностный микрослой и водную толщу, – больше представителей *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. Доля представителей *Gammaproteobacteria* и *Actinobacteria* сопоставима в микробиомах биопленок, поверхностного микрослоя и водной толщи (рис. 13).

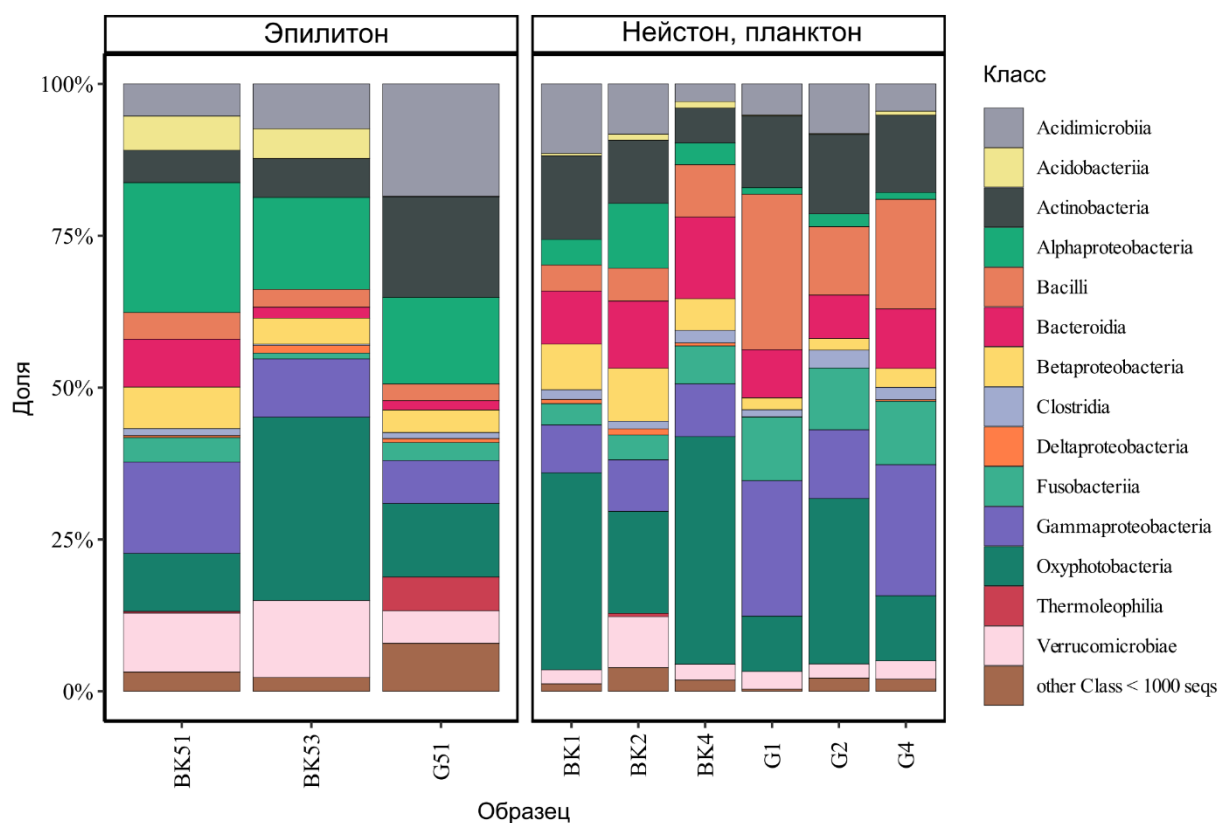


Рисунок 13 – Таксономический состав микробных сообществ эпилитона (G51, BK51, BK53), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал по данным метагеномного анализа фрагментов гена 16S рРНК.

Таксономический состав микробных сообществ эпилитных биопленок и воды различался также на уровне родов и семейств. В микробных сообществах биопленок среди *Alphaproteobacteria* выявлено много представителей порядков *Huymicrobiales* и *Rhodobacterales* (род *Tabrizicola*), в то время как представители клады SAR11 (*Pelagibacterales*) обнаружены исключительно в водной толще и поверхностном микрослое. Среди бактерий класса *Betaproteobacteria* в биопленках преобладали представители родов *Rhodofera*, *Leptothrix*, *Methylotenera*, в водной толще и поверхностном микрослое – представители рода *Limnohabitans*. Среди *Actinobacteria* также встречались «типичные водные виды»: к ним отнесены представители родов *hgcI_clade* (семейство *Sporichthyaceae*) и *CL500-29_marine_group* (семейство *Ilumatobacteraceae*).

Состав и структура сообществ цианобактерий в нейстоне (BK1, G1), планктоне (BK2, BK4, G2, G4) и эпилите (G51, BK51, BK52) описаны в исследовании О. И. Белых и соав. (Belykh et al., 2020). Водные цианобактерии представлены кластером *Synechococcus/Cyanobium* и *Dolichospermum lemmermannii*, тогда как бентосные цианобактерии родами *Tychoneta* sp., *Phormidium* sp., *Symplocastrum* sp., *Pseudanabaena* sp. и *Synechococcus* sp.

Показано, что на видовой состав сообществ значимо влияет географическое место отбора проб и экологическая ниша (рис. 14). Так, микробные сообщества биопленок и водной толщи сформировали отдельные кластеры, при этом микробные сообщества района пос. Б. Коты объединились в одну кладу, а микробные сообщества района пос. Б. Голоустное – в другую.

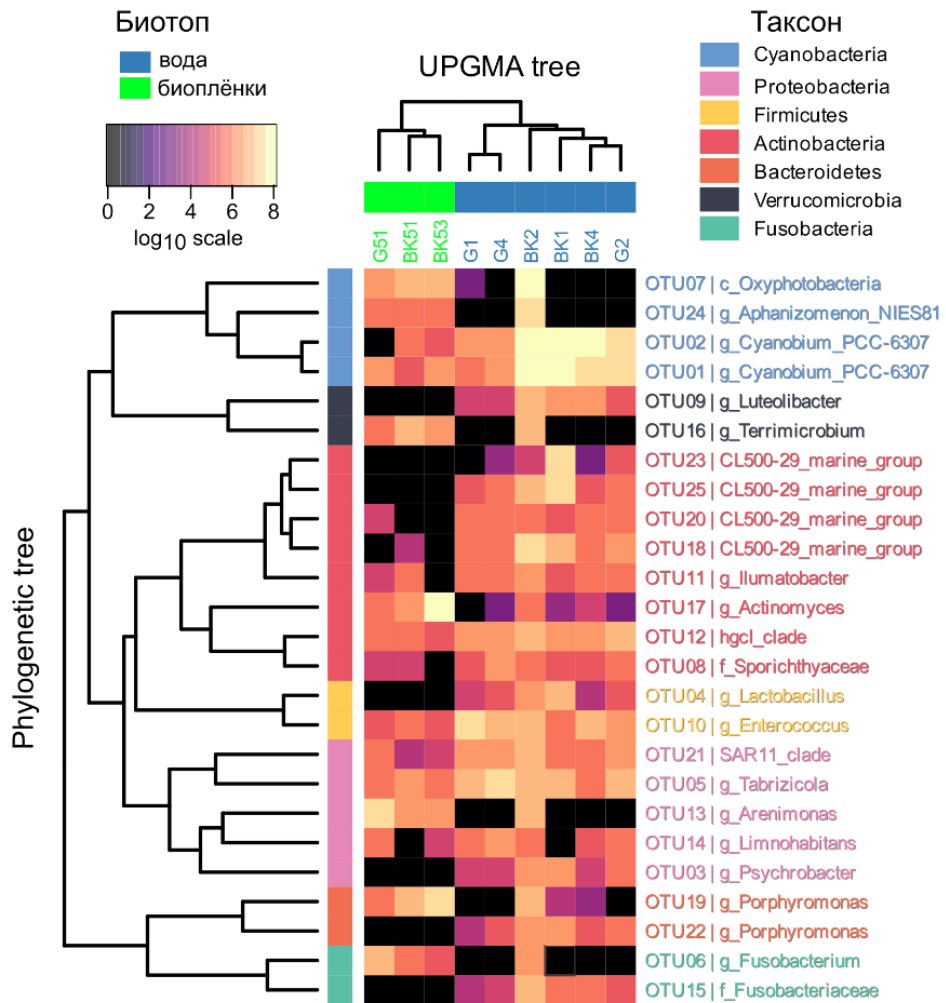


Рисунок 14 – Сходства и различия эпилита (G51, BK51, BK53), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал. Тепловая

карта 25 наиболее представленных ОТЕ гена 16S рРНК, UPGMA дендрограмма и филогенетическое древо.

Поскольку способность к денитрификации широко распространена среди многих филогенетически не связанных групп, подход на основе секвенирования гена 16S рРНК малопригоден для характеристики денитрифицирующих сообществ. Напротив, функциональные гены, кодирующие ферменты процесса, являются полезными маркерами для обнаружения денитрифицирующих организмов. Ключевой фермент денитрификации – нитритредуктаза – существует в двух эволюционно не связанных между собой вариантах – медьсодержащая и цитохром *cd1* содержащая, кодируемые генами *nirK* и *nirS*, соответственно. Денитрификаторы *nirS*-типа преобладают в окружающей среде (Helen et al., 2016).

Разнообразие денитрифицирующих бактерий по генам nirS и nirK

В целом для гена *nirS* получено 73318 нуклеотидных последовательностей, которые были сгруппированы в 81 ОТЕ (95% уровень сходства). Количество доминирующих ОТЕ, содержащих более 1% последовательностей, составило 24, они включали 81% от общего количества последовательностей (рис. 15, табл. 9).

BLASTx-анализ показал, что наибольшая доля *nirS*-содержащих бактерий принадлежала классу *Betaproteobacteria* (65%), представленному порядками *Rhodocyclales* (59%) и *Burkholderiales* (41%). Субдоминантами выступали бактерии класса *Alphaproteobacteria* (28%): порядки *Hyphomicrobiales* (42%), *Rhodospirillales* (30%) и *Rhodobacterales* (28%). Остальные 7% *nirS*-бактерий отнесены к классу *Gammaproteobacteria* и представлены порядками *Steroidobacterales* (30%), *Pseudomonadales* (22%), *Xanthomonadales* (22%), *Chromatiales* (10%) и неклассифицированными гаммапротеобактериями (16%).

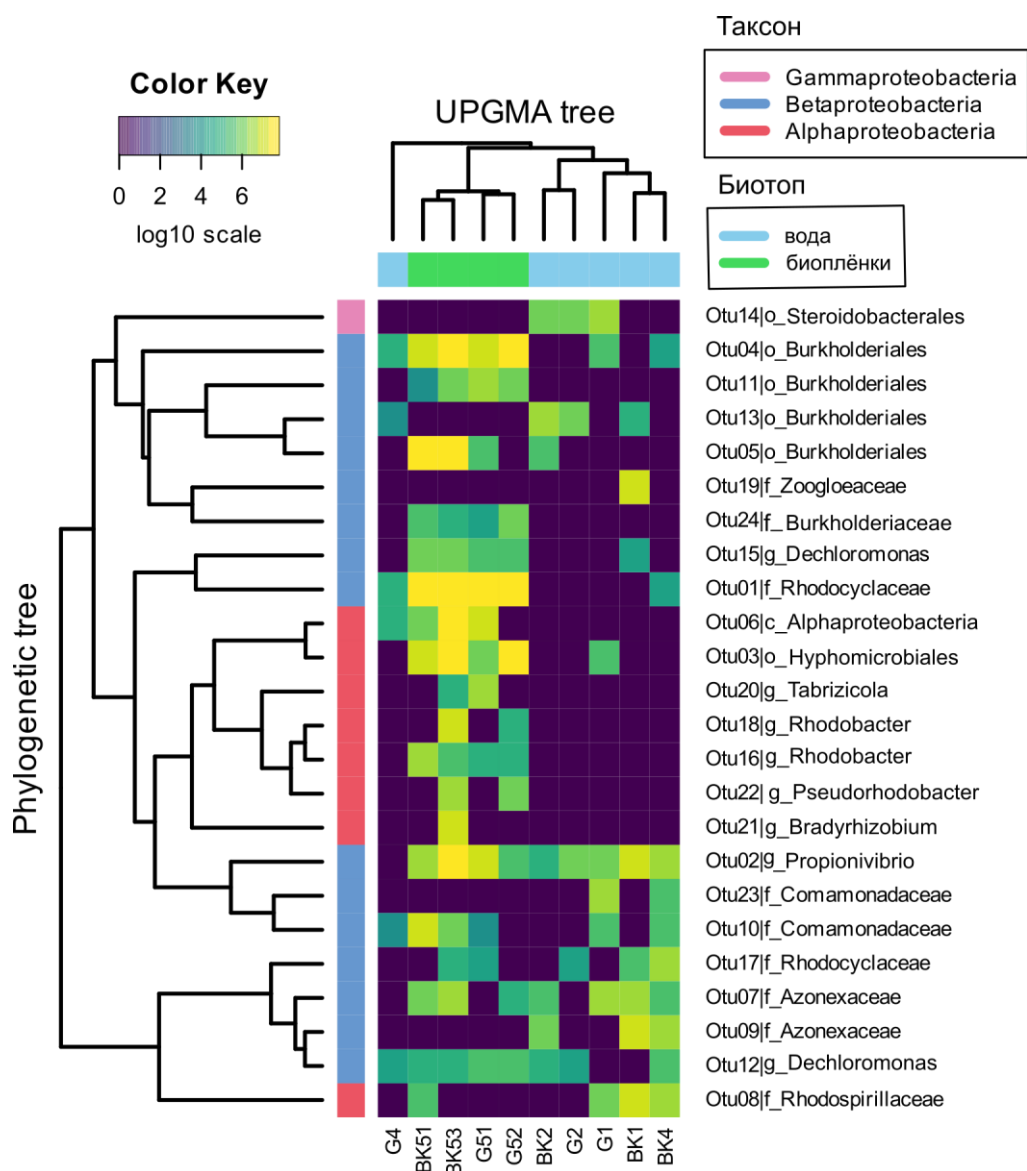


Рисунок 15 – Тепловая карта и филогенетическое древо 24 наиболее представленных ОТЕ гена *nirS*, UPGMA дендрограмма микробных сообществ эпилимна (BK51, BK53, G51, G52), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал.

Таксономическая идентификация репрезентативных аминокислотных последовательностей 81 ОТЕ выявила присутствие бактерий, родственных с *Aromatoleum*, *Propionivibrio*, *Stappia*, *Ideonella*, *Rhizobacter*, *Dechloromonas denitrificans*, *Magnetospirillum*, *Tepidimonas*, *Steroidobacter denitrificans*, *Rhodobacter*, *Zoogloea*, *Thauera*, *Tabrizicola*, *Bradyrhizobium*, *Paracoccus*, *Candidatus Accumulibacter*, *Rhodoferrax*, *Pseudomonas stutzeri* и др.

Среди идентифицированных родов *Dechloromonas* (*Betaproteobacteria*, *Rhodocyclales*) был самым многочисленным (14,5% от общего числа последовательностей) и встречался как в биопленочных обрастаниях, так и в воде (8 ОТЕ; сходство с культивируемыми гомологами 92-97%). Бактерии рода *Dechloromonas* входят в число доминирующих денитрификаторов и обнаруживаются в активном иле очистных сооружений, а также в почвах и пресноводных отложениях (Zhang et al., 2011; Chourey et al., 2013; McIlroy et al., 2016; Han, 2019).

Бактерии рода *Aromatoleum* (*Betaproteobacteria*, *Rhodocyclales*; 3 ОТЕ) составляли 10,6% от общего числа последовательностей и присутствовали в биопленочных обрастаниях (97,5%) и в небольшом количестве в придонной воде (2,5%). Род *Aromatoleum* включает денитрификаторов, специализирующихся на анаэробном разложении устойчивых органических соединений (ароматических и терпеноидов) (Weiten et al., 2021).

Представители рода *Propionivibrio* (*Betaproteobacteria*, *Rhodocyclales*; ОТЕ2) составляли 8,6% от общего числа последовательностей, они обнаружены во всех исследуемых образцах, за исключением G4. Известно, что бактерии рода *Propionivibrio* являются анаэробными денитрификаторами (Yuan et al., 2021).

Бактерии рода *Magnetospirillum* (*Alphaproteobacteria*, *Rhodospirillales*; 2 ОТЕ), составляющие 3,9% от общего числа последовательностей, найдены как в биопленочных сообществах, так и в сообществах воды. Виды *Magnetospirillum* являются факультативно анаэробными микроаэрофилами, которые проявляют различную устойчивость к кислороду и могут использовать нитрат в качестве акцептора электронов (Lins, 2009).

Согласно литературным данным, некоторые обнаруженные нами рода бактерий способны денитрифицировать в аэробных условиях: *Pseudomonas stutzeri*, *Rhodobacter*, *Paracoccus*, *Zoogloea*, *Thauera*, *Candidatus Accumulibacter*, *Bradyrhizobium*, *Steroidobacter denitrificans* и др. Аэробные денитрификаторы встречаются в природных экосистемах, на очистных

сооружениях и подобно анаэробным денитрификаторам обладают высокой способностью к денитрификации (Ji et al., 2015; Zhou et al., 2020). Присутствие аэробных денитрификаторов в экосистеме Байкала неудивительно, вследствие того, что воды озера высоко насыщены кислородом.

Бактерии, родственные с *Pseudomonas stutzeri* (Gammaproteobacteria, Pseudomonadales; 4 ОТЕ, сходство с гомологом 82-100%), составляли 1,4% от всех полученных последовательностей. Показана способность *Pseudomonas stutzeri* к аэробной денитрификации в атмосфере с высоким содержанием кислорода (Su et al., 2001). *Pseudomonas stutzeri* часто используют в качестве модельного организма для исследований денитрификации (Lalucat et al., 2006).

Представители рода *Zoogloea* (Betaproteobacteria, Rhodocyclales; ОТЕ19) выявлены в поверхностном микрослое воды, их вклад достигал 1,4% от всех последовательностей. Ранее сообщалось, что *Zoogloea* sp. N299, изолированная из осадков водохранилища Чжоуцунь, проводила аэробную денитрификацию (Huang et al., 2015).

Thauera (Betaproteobacteria, Rhodocyclales; 2 ОТЕ, сходство с культивируемым гомологом 91% и 99%) определен как ключевой род гетеротрофной нитрификации и аэробной денитрификации в гранулированных реакторах (Pishgar et al., 2019). Также полагают, что аэробные денитрифицирующие бактерии родов *Zoogloea* и *Thauera* играют важную роль в биоремедиации, восстанавливая нитраты и нитриты в активном или очистных сооружениях (Thomsen et al., 2007).

Бактерии рода *Bradyrhizobium* (Alphaproteobacteria, Nuyphomicrobiales; 5 ОТЕ), выявленные в эпилитных биопленках (BK53, G51), составляли 2,7% от общего числа последовательностей. Помимо азотфиксации, *Bradyrhizobium* проводит аэробную денитрификацию. Обычно нитритредуктазу в ризобиях кодирует ген *nirK*, хотя о *Bradyrhizobium* с геном *nirS* также сообщалось (Sánchez et al., 2018).

Бактерии *Steroidobacter denitrificans* (Gammaproteobacteria, Nevskiales; ОТЕ14) обнаружены в водной толще – 2% от общего количества

последовательностей. *Steroidobacter denitrificans* использует стероидные гормоны (эстрадиол и тестостерон) в качестве единственного источника углерода и энергии, восстанавливая нитрат до газообразного азота как в аэробных, так и в анаэробных условиях (Fahrbach et al., 2008; Wang et al., 2013). Стероидные гормоны поступают в окружающую среду в результате жизнедеятельности млекопитающих и в большом количестве от фармацевтической промышленности, биотрансформация этих соединений микроорганизмами очень важна вследствие их негативного воздействия на окружающую среду.

Методом UPGMA показано, что *nirS*-содержащие бактерии, населяющие биопленки каменистых субстратов, достоверно отличаются по видовому составу от *nirS*-содержащих бактерий, обитающих в сообществах воды (рис. 15).

Денитрификаторы класса *Betaproteobacteria* обнаружены во всех исследуемых биотопах. Доминирующий род *Dechloromonas* (*Rhodocyclales*) встречался повсеместно, при этом выявлены водные флотипы (3 ОТЕ), биопленочные флотипы (1 ОТЕ) и флотипы, представленные как в биопленках, так и в воде (4 ОТЕ). Представители рода *Tepidimonas* (*Burkholderiales*, ОТЕ11) обнаружены исключительно в биопленках. Известно, что бактерии данного рода являются индикаторами раннего образования биопленок на фабриках по производству бумаги (Zumsteg et al., 2017). Флотипы, родственные с *Rubrivivax* (*Burkholderiales*), встречались исключительно в образцах воды. В биопленках, в отличие от воды, выявлены все флотипы порядков *Hyphomicrobiales* и *Rhodobacterales* класса *Alphaproteobacteria*, за исключением двух ОТЕ, обнаруженных в поверхностном микрослое воды.

Анализ индексов Шеннона и Chao1 демонстрируют, что наибольшее разнообразие и видовое богатство денитрификаторов *nirS*-типа характерно для образцов эпилитона (G51, BK53), наименьшее для образцов водной толщи (G2, BK2) (табл. 9).

Таблица 9 – Богатство и разнообразие последовательностей генов *nirK* и *nirS* в различных биотопах литоральной зоны оз. Байкал

Ген	Образец	Количество последовательностей	Количество ОТЕ (95%)	Количество эндемичных ОТЕ*	Индексы богатства и разнообразия		Покрывтие (%)
					Chao1	Shannon	
<i>nirS</i>	BK1	6687	18	7	18	2,35	1
	BK2	2618	10	1	10	1,97	1
	BK4	6323	19	1	19	2,75	1
	BK51	11788	22	4	22	2,63	0,99
	BK53	19353	28	7	28	2,82	0,99
	G1	4792	20	8	20	2,61	0,99
	G2	1684	7	0	7	1,78	1
	G4	563	6	0	нд	нд	нд
	G51	11539	31	11	31	2,99	0,99
	G52	7971	19	2	19	2,31	0,99
<i>nirK</i>	BK1	2608	12	1	12	2,09	1
	BK2	6694	23	2	24	2,35	0,99
	BK4	5299	19	2	19	2,17	0,99
	BK51	11813	21	4	21	1,90	0,99
	BK53	3054	20	6	20	2,47	0,99
	G1	3616	42	22	42	2,87	0,99
	G2	3201	18	1	20	2,43	0,99
	G4	15557	50	20	52	2,83	0,99
	G51	14918	32	12	34	2,46	0,99
	G52	9511	16	1	16	2,06	0,99

Примечание. Образцы станций Б. Коты (BK) и Б. Голоустрое (G): BK1 и G1 – поверхностный микрослой воды, BK2 и G2 – водная толща, BK4 и G4 – придонный слой воды, BK51, BK53, G51 и G52 – биопленки каменистых субстратов. *Эндемичные ОТЕ, обнаруженные только в одном образце. Нд - нет данных.

Для гена *nirK* получено 76269 последовательностей. Нуклеотидные последовательности были объединены в 122 ОТЕ (95% уровень сходства). Количество доминирующих ОТЕ (>1% последовательностей) составило 21, они содержали 82% от общего количества последовательностей (рис. 16, табл. 9).

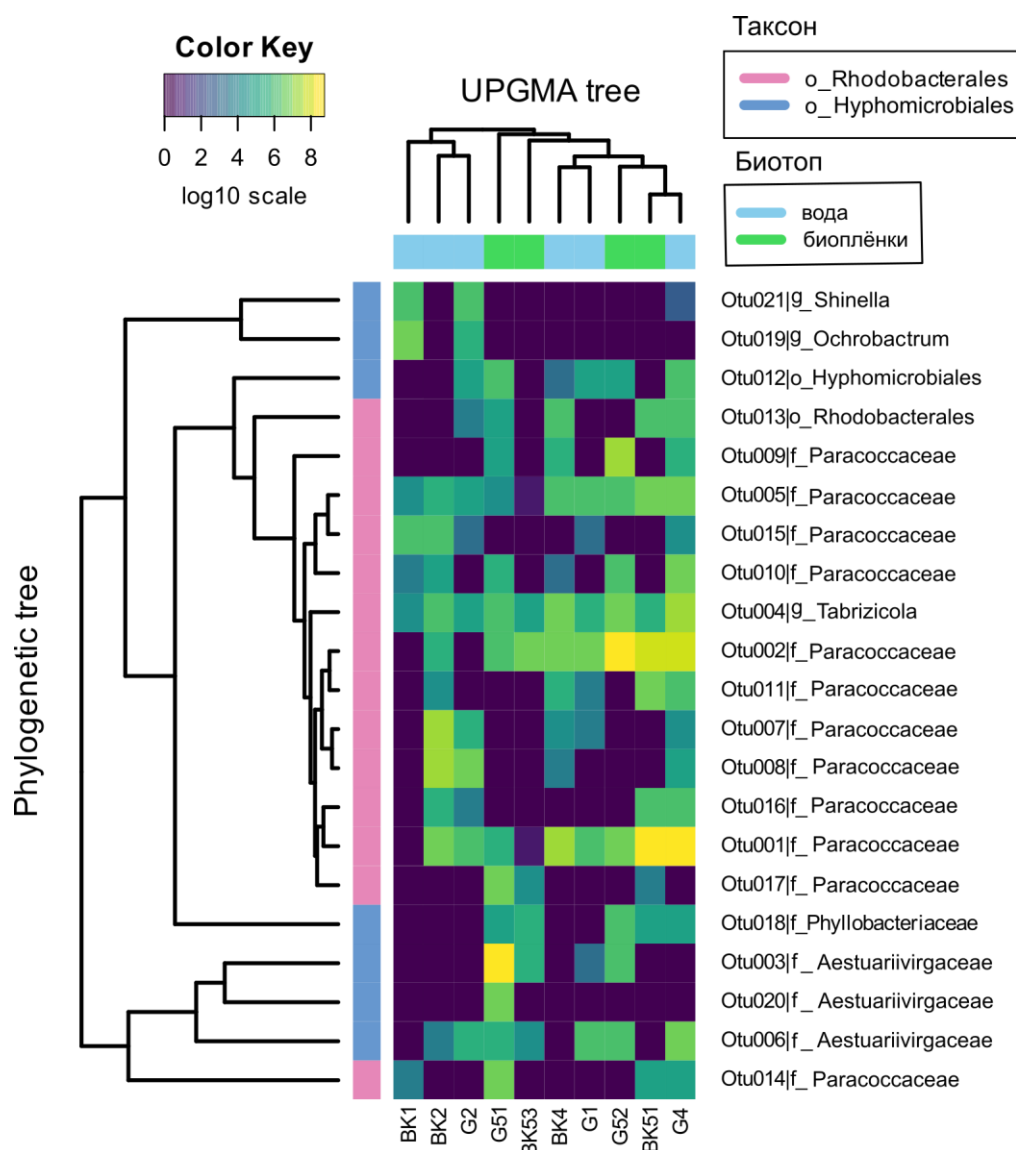


Рисунок 16 –Тепловая карта и филогенетическое дерево 21 наиболее представленной ОТЕ гена *nirK*, UPGMA дендрограмма микробных сообществ эпилимтона (BK51, BK53, G51, G52), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал.

BLASTx-анализ показал, что бактерии *nirK*-типа представлены классом *Alphaproteobacteria* (99,96%): порядками *Rhodobacterales* (78%) и *Hyphomicrobiales* (22%). Только одна ОТЕ (0,03% последовательностей) отнесена к классу *Betaproteobacteria* и одна ОТЕ (0,01% последовательностей) к классу *Deltaproteobacteria*.

Установлено, что большая часть последовательностей (69,5%) связана с бактериями рода *Tabrizicola* (*Alphaproteobacteria*, *Rhodobacterales*; 60 ОТЕ,

сходство с гомологом 82-99%). Поскольку этот род обнаружен относительно недавно, его экология еще недостаточно изучена. Анализ геномов *Tabrizicola*, представленных в базе данных NCBI, показал наличие гена *nirK*, кодирующего медьсодержащую нитритредуктазу. Известно, что типовой штамм *Tabrizicola aquatica* RCRI19T, выделенный из озера Кури-гол, восстанавливает нитраты и продуцирует бактериохлорофилл *a* в аэробных гетеротрофных условиях (Tarhriz et al., 2013; Tarhriz et al., 2019).

Бактерии родственные с *Pseudorhodobacter* (*Alphaproteobacteria*, *Rhodobacterales*; 7 ОТЕ, сходство с гомологом 92-99%) составляли 1,4% от всех полученных последовательностей. Для *Pseudorhodobacter* показана способность к денитрификации и аккумуляции фосфора (Tao et al. 2023).

В образцах воды (BK1, G2) обнаружены последовательности родственные с *Ochrobactrum* sp. 3CB4 (*Alphaproteobacteria*, *Hyphomicrobiales*; ОТЕ19; сходство 100%), денитрифицирующей бактерией, разлагающей галобензоат (Song, Ward 2003), *Bradyrhizobium* sp. (*Alphaproteobacteria*, *Hyphomicrobiales*; ОТЕ31, сходство 98%) и *Rhizobium subbaraonis* (*Alphaproteobacteria*, *Hyphomicrobiales*; ОТЕ 47, сходство 98%). Бактерии рода *Rhizobium* вносят значительный вклад в азотфиксацию, а также способны выполнять денитрификацию, ведущую к потерям азота в почве (Behrendt et al., 2016).

Методом UPGMA показано, что *nirK*-содержащие бактерии, обитающие в биопленках на каменистых субстратах и сообществах воды, достоверно не отличаются по видовому составу (рис. 16).

Согласно индексам Шеннона и Chaol, наибольшим разнообразием денитрификаторов *nirK*-типа характеризовались образцы поверхностного микрослоя воды (G1) и придонной воды (G4). Наименьшее таксономическое разнообразие по индексу Шеннона обнаружено в образце эпилитона (BK51), по индексу Chaol в образце поверхностного микрослоя воды (BK1) (табл. 9). Интересно отметить, что в придонном слое воды (G4), где выявлено максимальное разнообразие *nirK*-содержащих денитрифицирующих бактерий

(50 ОТЕ), бактерии с *nirS* геном представлены минимальным количеством филоципов (6 ОТЕ).

Доля количества последовательностей гена *nirK* микробных сообществ эпиплтона и воды сопоставима – 52 и 48 % соответственно, последовательностей гена *nirS* – 69 и 31% соответственно. Данная особенность может объясняться тем, что бактерии *nirK*-типа распространены в средах с различным содержанием кислорода, в то время как, *nirS*-содержащие бактерии более чувствительны к повышенным концентрациям кислорода и чаще встречаются в анаэробных условиях (Knapp et al., 2009).

С помощью RDA анализа показано, что видовое богатство *nirK*-бактерий в придонном слое воды на исследуемых станциях связано с более высокой концентрацией нитратного азота (рис. 17). Можно предположить, что обилие наиболее представленных ОТЕ поверхностного микрослоя на станции напротив пос. Б. Коты будет снижаться с увеличением концентрации нитратного азота, в то время как в водной толще не изменится.

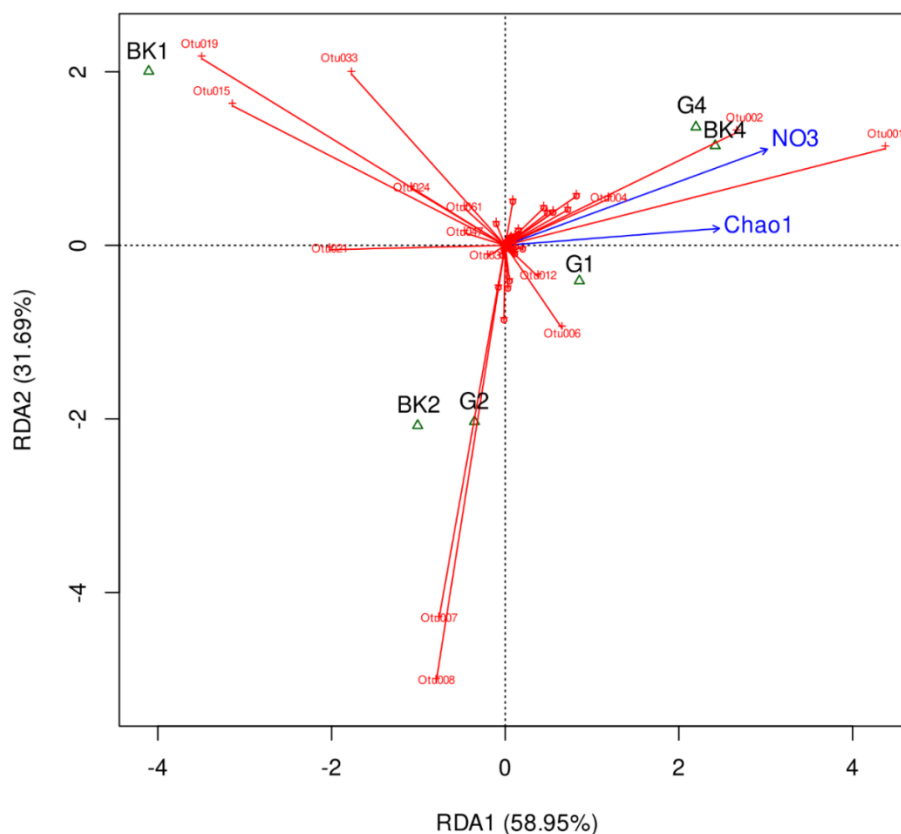


Рисунок 17 – Канонический анализ избыточности (RDA), показывающий взаимосвязь структуры *nirK*-содержащих денитрифицирующих сообществ с факторами окружающей среды ($p < 0,05$). Образцы станций Б. Коты (BK) и Б. Голоустное (G) представлены треугольниками: BK1 и G1 – поверхностный микрослой воды, BK2 и G2 – водная толща, BK4 и G4 – придонный слой воды.

Ранее сообщалось, что высокая доступность субстрата (нитрата) и углерода повышала генетический потенциал денитрификации, в частности разнообразие денитрифицирующих микробных сообществ (Aalto et al., 2019). В связи с недостаточной выборкой мы не смогли выявить другие достоверные корреляционные взаимоотношения.

Таким образом, впервые с помощью метода высокопроизводительного секвенирования ампликонов функциональных генов исследовано разнообразие денитрификаторов, населяющих различные биотопы оз. Байкал. Традиционные подходы (культивирование, DGGE, библиотека клонов и др.), применяемые для обнаружения денитрификаторов в различных средах, могут недооценивать их разнообразие и являются достаточно трудоемкими. Применение современного молекулярного метода позволило более точно и подробно описать сообщества денитрифицирующих бактерий. Выявлено, что *nirK*-бактерии представлены порядками *Rhodobacterales* и *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*, *nirS*-бактерии – порядками *Burkholderiales* и *Rhodocyclales* класса *Betaproteobacteria*, *Hyphomicrobiales*, *Rhodobacterales* и *Rhodospirillales* класса *Alphaproteobacteria*, *Steroidobacterales*, *Xanthomonadales*, *Pseudomonadales* и *Chromatiales* класса *Gammaaproteobacteria*. Наиболее высокое разнообразие *nirS*-содержащих бактерий характерно для микробных сообществ биопленок каменистых субстратов, *nirK*-содержащих бактерий – для придонной воды. В целом, разнообразие денитрифицирующих бактерий оз. Байкал сопоставимо с другими изученными водоемами, где наиболее распространенные

последовательности гена *nirS* также соответствовали классу *Betaproteobacteria*, а наиболее распространенные последовательности гена *nirK* классу *Alphaproteobacteria* (Vila-Costa et al., 2014; Saarenheimo et al., 2015).

4.4. Разнообразие нитрифицирующих бактерий в микробных сообществах воды и эпилитных биопленок по данным высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК

Нитрификация – процесс окисления аммиака до нитрата через нитрит. На первом этапе аммиак окисляется до нитрита аммонийокисляющими бактериями (АОБ) или археями (АОА), затем образовавшийся нитрит окисляет до нитрата нитритокисляющими бактериями (НОБ). Генетическое разнообразие нитрифицирующих бактерий обычно исследуют, применяя в качестве молекулярных маркеров ген 16S рРНК или гены, кодирующие основные ферменты процесса (Kowalchuk et al., 1997; Rotthauwe et al., 1997).

Для оценки разнообразия АОБ и НОБ в микробных сообществах литоральной зоны оз. Байкал проведено метагеномное секвенирование ампликонов гена 16S рРНК для проб эпилитных биопленок (15 образцов), поверхностной (14 образцов) и придонной (12 образцов) воды, отобранных в июне, августе и сентябре 2017 г. в трех котловинах озера.

АОБ выявлены в 60% исследуемых проб в небольшом количестве, составляя менее 1% от общего количества последовательностей. В поверхностной воде в августе и в придонной воде в сентябре АОБ не обнаружены. Таксономический состав АОБ представлен семейством *Nitrosomonadaceae* (*Betaproteobacteria*) – 47 филогенов (ОТЕ, кластерное расстояние 0,03). Данное семейство, в свою очередь, представлено родами *Nitrospira* (3 ОТЕ), некультивированными Ellin6067 (27 ОТЕ), MND1 (5 ОТЕ), 966-1 (2 ОТЕ), mle1-7 (2 ОТЕ), GOUTA6 (1 ОТЕ), oc32 (1 ОТЕ), cr616 (1 ОТЕ), IS-44 (1 ОТЕ), DSSD61(1 ОТЕ) и неидентифицированными бактериями (3 ОТЕ). Представители Ellin6067 доминировали и составляли значительную

долю окислителей аммония во всех исследуемых микробных сообществах. Два фило типа (OTU03825 Ellin6067, OTU01716 Ellin6067) присутствовали как в воде, так и в эпилитных биопленках. Бактерии рода *Nitrosospira* обнаружены только в водной толще (рис. 18).

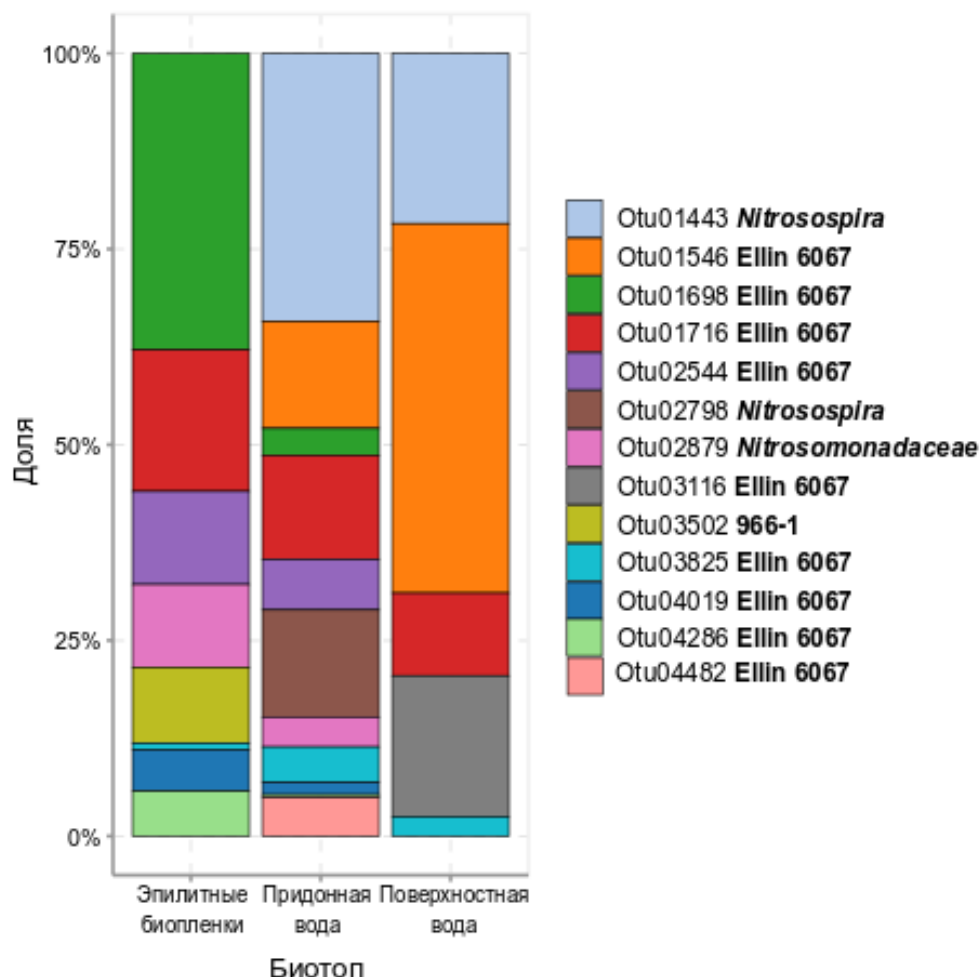


Рисунок 18 – Таксономический состав аммонийокисляющих бактерий в сообществах эпилитона и планктона литоральной зоны оз. Байкал по данным анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК. Представлены ОТЕ, доля которых составила не менее 1,5% от всех полученных последовательностей.

В общем, наибольшее разнообразие АОБ характерно для микробных сообществ эпилитных биопленок (28 OTU) и придонной воды (19 OTU), наименьшее – для поверхностной воды (13 OTU). Известно, что аэрируемая

придонная вода, соприкасающаяся с донными отложениями, является наиболее благоприятной экологической нишей биологического окисления аммония (Кузнецов и др., 1985). Напротив, в поверхностной воде аммоний-окислители вынуждены конкурировать за субстрат (NH_4^+) с фотоавтотрофами (Smith et al., 2014). Также было показано значительное ингибирующее влияние света на активность фермента аммониймонооксигеназы (Merbt et al., 2017).

По результатам BLAST-анализа, ближайшими родственниками АОБ из оз. Байкал являются некультивируемые бактерии, обнаруженные в ассоциации с глубоководными байкальскими губками *Baikalospongia intermedia*, в воде озер Женевское, Мистическое, Мичиган, Онтарио, Йеллоустоун, Рилфут, Эспехо, Мизугаки, в донных отложениях озер Тайху, Касумигаура, Виртсъярв, Дунпин, олиготрофного озера Анд, в ассоциации с частицами оз. Дянчи, в пемзе оз. Науэль-Уапи, в перифитоне пресноводного озера, эпицитоне арктической реки, почвах ледников и др.

Филогенетический анализ планктонных последовательностей OTU02798, OTU06957, OTU01443 с ближайшими гомологами и типовыми штаммами (рис. 19) показал, что флотипы OTU02798 и OTU06957, родственные с *Nitrosospira* sp. Nsp57 (98,85%) и *Nitrosospira* sp. 17SS (97,24%) соответственно, вошли в кластер рода *Nitrosospira*. Флотип OTU01443, сходный с *Nitrosospira briensis* Nsp10 из почвы (Aakra et al., 2001) и *Nitrosomonas* sp. NS20 из морских отложений (Urakawa et al., 2006), на 96,57% и 95,88% соответственно, образует отдельную линию с бактериями, определенными в планктоне других пресных озер (Preheim et al., 2013; Kojima et al., 2014). Известно, что бактерии в пределах родов *Nitrosomonas* и *Nitrosospira*, как правило, образуют отдельные кластеры в зависимости от их распространения в средах, характеризующихся различными экологическими условиями (Koops, Pommerening-Roser, 2001; Purkhold et al., 2003).

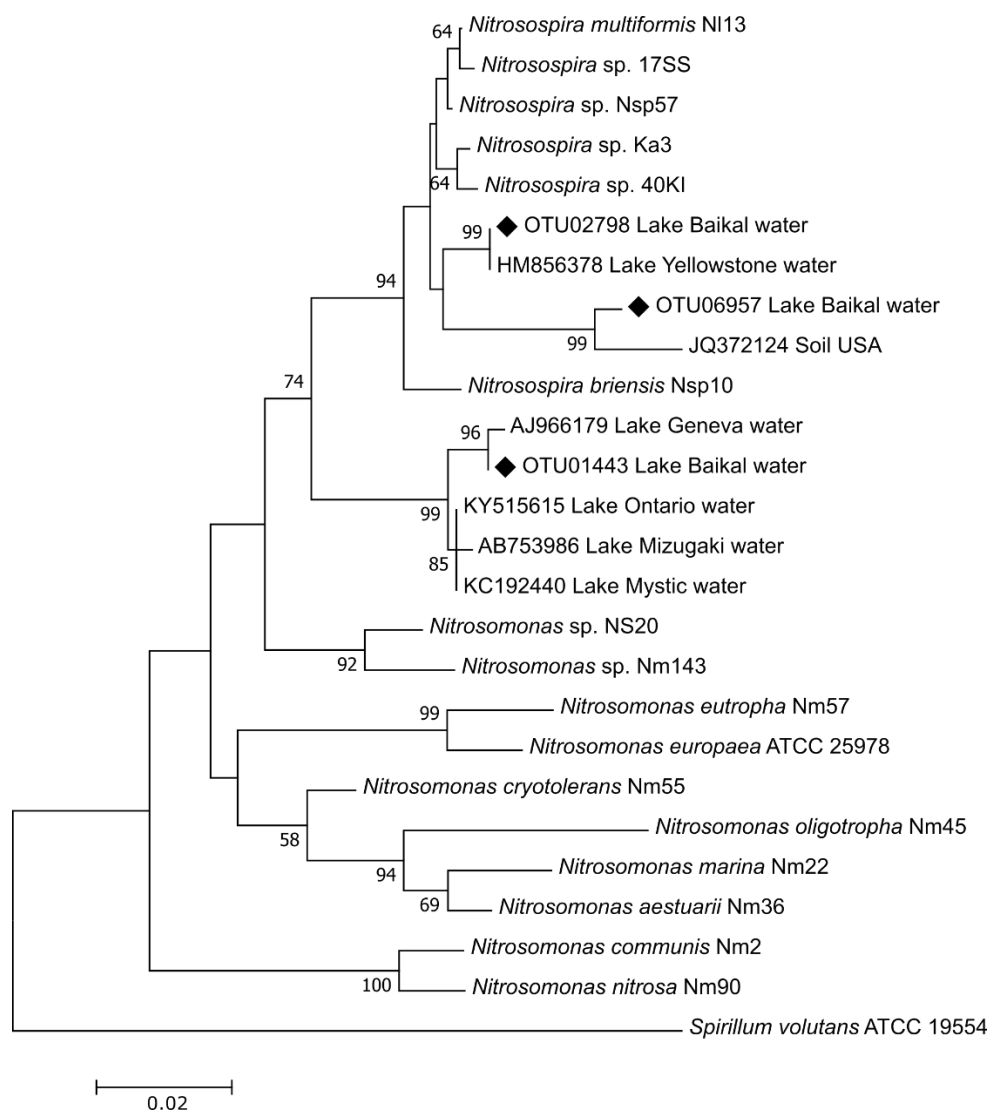


Рисунок 19 – Филогенетическое древо аммонийокисляющих бактерий, построенное с помощью метода ближайших соседей по данным фрагментов гена 16S рРНК (438 п.н.). Последовательности из оз. Байкал отмечены знаком ◆. Масштаб соответствует двум нуклеотидным заменам на каждые 100 п.н. Бутстреп-анализ проведен для 1000 реплик, значения менее 50% не указаны.

Вследствие того, что используемые в работе праймеры помимо бактерий выявляют некоторых архей, на одной из станций южной котловины в придонной воде обнаружены представители семейства *Nitrosopumilaceae*: *Candidatus Nitrosopumilus* (1 ОТЕ) и *Candidatus Nitrosoarchaeum* (2 ОТЕ). Ближайшие родственники выявленных флотипов – археи из микробного сообщества *Thioploca* sp. (район холодного метанового сипа «Посольская Банка», оз. Байкал), из воды оз. Маджоре, донных отложений олиготрофного

озера Анд и др. Известно, что все культивируемые представители филума *Thaumarchaeota* обладают способностью окислять аммоний (French et al., 2012).

Ранее представители таумархеот обнаружены в донных отложениях Южного Байкала, в разных слоях осадков их доля составляла от 1 до 100% (Земская и др., 2018). В микробном сообществе метанового сипа «Посольская Банка» последовательности филума *Thaumarchaeota* численно доминировали в поверхностном слое отложений (Черницына и др., 2016). Многие исследователи отмечали важную роль АОА в окислении аммиака в олиготрофных водоемах (Auguet, Casamayor, 2013; Park et al., 2010).

НОБ выявлены в 38% исследуемых проб в минорном количестве, составляя менее 0,5% от общего количества последовательностей. В поверхностной воде в августе и в поверхностной и придонной воде в сентябре НОБ не обнаружены ни в одной исследуемой пробе. Общее разнообразие НОБ представлено родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga* (*Gamma proteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospinota*.

Бактерии р. *Nitrospira* (7 ОТЕ) доминировали и встречались повсеместно. При этом стоит отметить, что для сообществ биопленок и воды общих ОТЕ не выявлено. В биопленочных обрастаниях доминировал флотип OTU01960, в водной толще – флотип OTU00830 (рис. 20). Ближайшим гомологом планктонного флотипа OTU00830 является некультивируемая бактерия, обнаруженная в ассоциации с байкальскими эндемичными губками *Lubomirskia baicalensis*. Данный вид губок входит в число доминирующих и встречается в литоральной зоне оз. Байкал на разных глубинах (Pile et al., 1997). Биопленочный флотип OTU01960 наиболее тесно связан с некультивируемыми бактериями, выявленными в осадках арктического олиготрофного оз. Чар (Канада) и пресного оз. Ибараки (Япония). Ближайший культивируемый гомолог данных флотипов (96% сходства), типовой штамм

Nitrospira japonica (NR_114396), изолирован из активного ила станции очистки сточных вод (Ushiki et al., 2013).

Возможно, что некоторые из выявленных нами филогенов способны проводить полное окисление аммония до нитрата. В исследованиях было показано, что «комаммокс» *Nitrospira* часто встречается в олиготрофных местах обитания, где она конкурирует за субстрат с АОБ и АОА, обладая более высоким сродством к аммонии (Kits et al., 2017). Гены «комаммокс» amoA обнаружены во многих биотопах, в том числе и в пресноводных биопленках (Zhao et al., 2022).

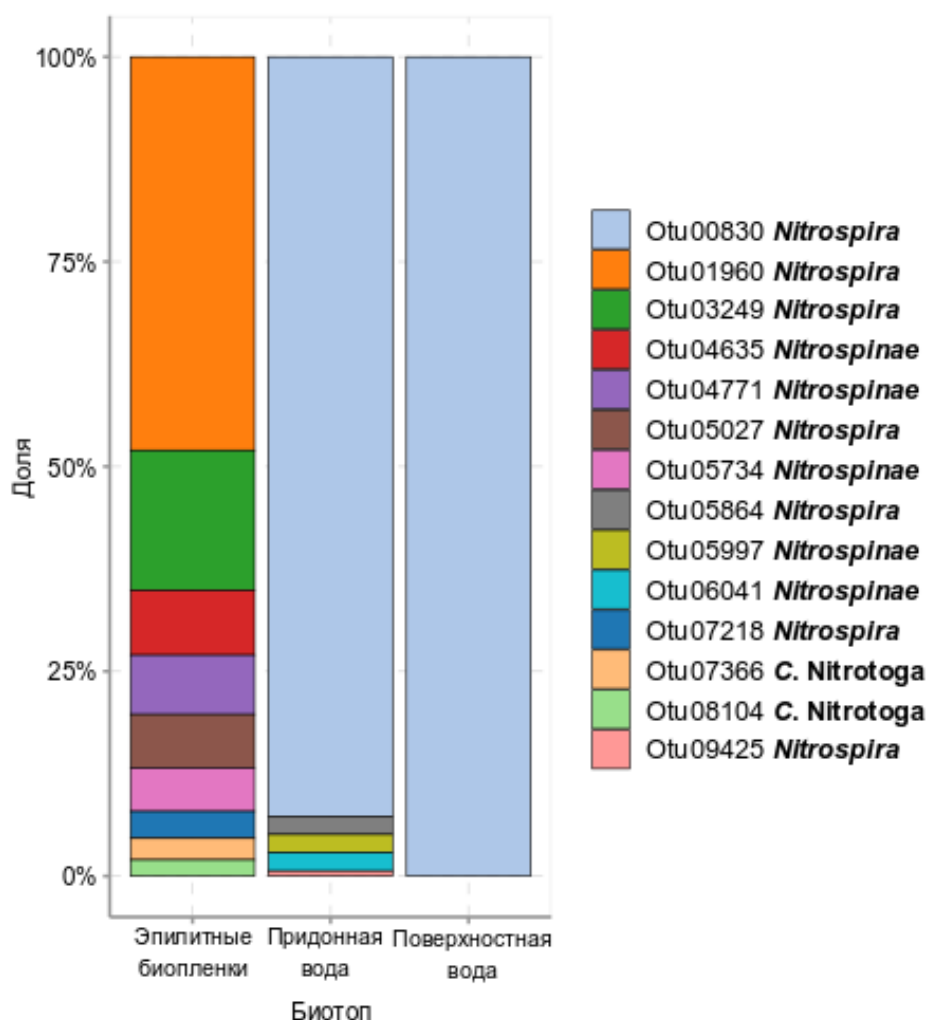


Рисунок 20 – Таксономический состав нитритокисляющих бактерий в сообществах эпилитона и планктона литоральной зоны оз. Байкал по данным анализа последовательностей фрагментов гена 16S рРНК

Представители рода *Nitrospira* широко распространены, они встречаются в очистных сооружениях (Daims et al., 2001) и в природных местообитаниях, таких как почвы (Freitag et al., 2005), донные отложения (Altmann et al., 2003), океаны (Watson et al., 1986), горячие источники (Lebedeva et al., 2005). Ранее на оз. Байкал ряд исследователей отмечали присутствие филы *Nitrospirota* в микробных сообществах планктона (Парфенова и др., 2013), поверхностного микрослоя воды (Галачьянц, 2017), донных отложений (Lomakina et al., 2014; Земская и др., 2018), биопленок (Парфенова и др., 2013), в подледных микробных сообществах (Башенхаева, 2018), а также в микробиомах губок (Калюжная, Ицкович, 2014; Краснопеев и др., 2016).

Неидентифицированные бактерии филы *Nitrospinota* выявлены в биопленках и придонной воде на станциях зал. Лиственничный и г. Северобайкальск.

Известно, что бактерии рода *Nitrospina* являются доминирующими нитрит-окислителями в Мировом океане (Pachiadaki et al., 2017). Отмечена их микроаэрофильная природа в связи с присутствием в морских зонах с минимальным содержанием кислорода (Fuchsman et al., 2011) и морских отложениях (Jorgensen et al., 2012). В донных отложениях озера Байкал (метановый сип «Посольская Банка») также в значительных количествах выявлены молекулярные маркеры семейства *Nitrospinaceae*, в поверхностных слоях их доля составляла от 4,9 до 8,8 % (Черницына и др., 2016).

В биопленочных обрастаниях на станции м. Елохин обнаружены последовательности, гомологичные кандидатному роду *Nitrotoga* (OTU08104, OTU07366). Сходство с ближайшим культивируемым родственником «*Ca. Nitrotoga arctica*» (DQ839562), изолированным из многолетнемерзлых грунтов Сибири (Alawi et al., 2007), составило 99,77% и 97,93%, соответственно.

Известные места обитания «*Ca. Nitrotoga*» включают почву (Alawi et al., 2007), донные отложения (Ishii et al., 2017), биопленки биофильтров (Hüpeden et al., 2016) и пещер (Chen et al., 2009), подледные озера (Achberger et al., 2016),

реки (Li et al., 2011), сточные воды (Lücker et al., 2015) и др. Для понимания экологической роли столь широко распространенных окислителей нитрита исследуют физиологические свойства обогащенных или чистых культур. К настоящему моменту известно, что бактерии рода *Nitrotoga* могут адаптироваться к низкой температуре, а увеличение концентрации нитрита в среде стимулирует их рост и преобладание над родом *Nitrospira* (Hüpeden et al., 2016; Kinnunen et al., 2017). Обнаружение не свойственных для экосистемы озера представителей рода *Candidatus Nitrotoga* в биопленках, отобранных на станции в районе м. Елохин, свидетельствует о повышенной нитритной нагрузке, вероятно, обусловленной масштабными пожарами, произошедшими годом ранее.

Таким образом, в результате исследований установлено, что основное разнообразие АОБ в микробных сообществах эпилитных биопленок и планктона литоральной зоны оз. Байкал представлено семейством *Nitrosomonadaceae*. Таксономический состав НОБ представлен родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga* (*Gammaproteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospinota*.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСТОЧНИКА АЗОТА НА РОСТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

С помощью сканирующей электронной микроскопии выявлены особенности роста штаммов *Rhizobium* sp. 2А (*Alphaproteobacteria*; *Hyphomicrobiales*), *Pseudomonas* sp. 1СБ (*Gammaproteobacteria*; *Pseudomonadales*) и *Streptomyces* sp. 21А (*Actinomycetes*; *Kitasatosporales*) в зависимости от доступности источников азота.

Штамм *Rhizobium* sp. 2А формировал биопленку на стекле в среде с нитратом (рис. 21 а-в) и в среде без доступного азота (рис. 21 г-е) в течение 7 суток культивирования. При микроскопическом наблюдении в среде без доступного источника азота отмечали увеличение диаметра клеток бактерии в 2 раза и более интенсивное образование слизи, что можно рассматривать как механизм защиты нитрогеназного комплекса от повреждающего действия кислорода. Так на 7-е сутки культивирования диаметр клеток в среде с нитратом составил 0,75 мкм (SD=0,13), без азота – 1,50 мкм (SD=0,16). Длина клеток практически не изменялась и составила 2,76 мкм (SD=0,72) и 2,64 мкм (SD=0,41) соответственно.

Известно, что многие азотфиксирующие бактерии не способны ассимилировать N_2 в условиях высокого содержания O_2 в окружающей среде. Исключением являются микроорганизмы, способные защищать нитрогеназу благодаря физиологическим и морфологическим особенностям. К примеру, у *Azotobacter vinelandii* механизм дыхательной защиты состоит из двух физиологических процессов: увеличения скорости дыхания и уменьшения скорости диффузии кислорода в клетку (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005). С точки зрения морфологических приспособлений для *A. vinelandii* характерно образование плотной полисахаридной капсулы вокруг клетки, что обнаружено и у штамма *Rhizobium* sp. 2А.

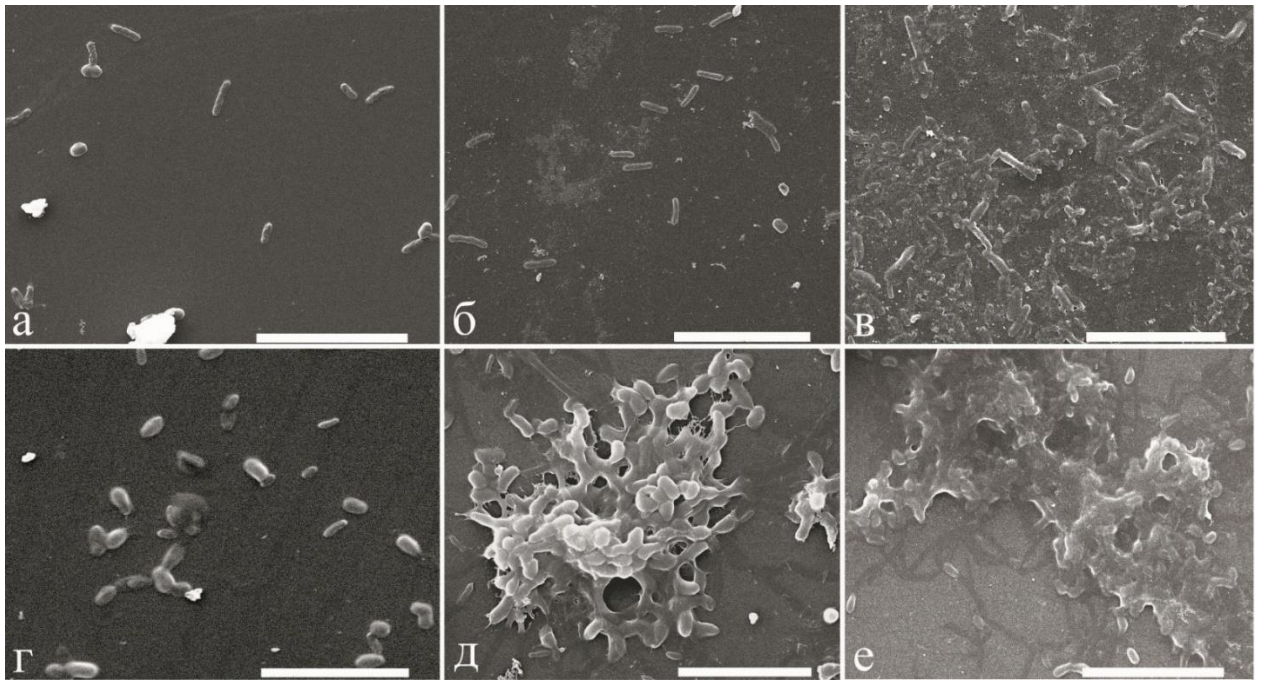


Рисунок 21 – Образование биопленки штаммом *Rhizobium* sp. 2A. на 3 (а), 5 (б), 7 (в) сутки культивирования в среде с нитратом и на 3 (г), 5 (д), 7 (е) сутки культивирования в среде без доступного источника азота. СЭМ.

Масштаб: а-д – 10 мкм, е – 20 мкм.

Наличие такой капсулы приводит к значительному увеличению толщины не перемешиваемого слоя и понижению коэффициента диффузии внутри него. Скорость продукции экзополисахаридов – «строительного материала» капсулы – повышается при увеличении концентрации O_2 и при переходе культуры к diazotrophic growth, то есть в тех условиях, когда необходима реализация механизма дыхательной защиты (Sabra et al., 2000; Берцова и др., 2005).

Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А формировали биопленку на стекле только в среде с нитратом (рис. 22, 23), в среде без азота обнаружены единичные клетки бактерий.

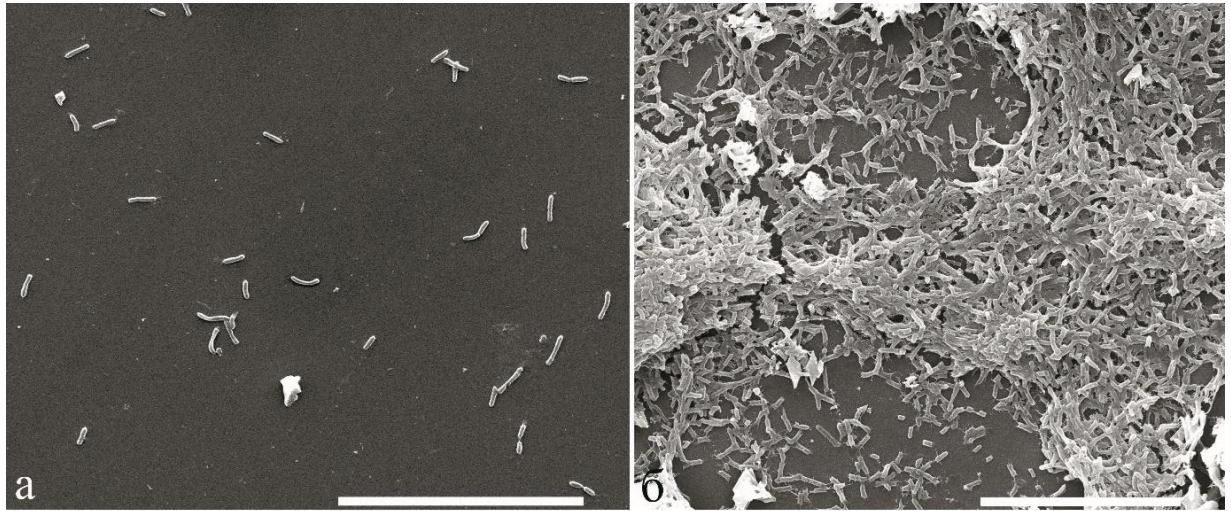


Рисунок 22 – Образование биопленки штаммом *Pseudomonas* sp. 1СБ в среде с нитратом на 3 (а) и 7 (б) сутки культивирования. СЭМ. Масштаб – 20 мкм.

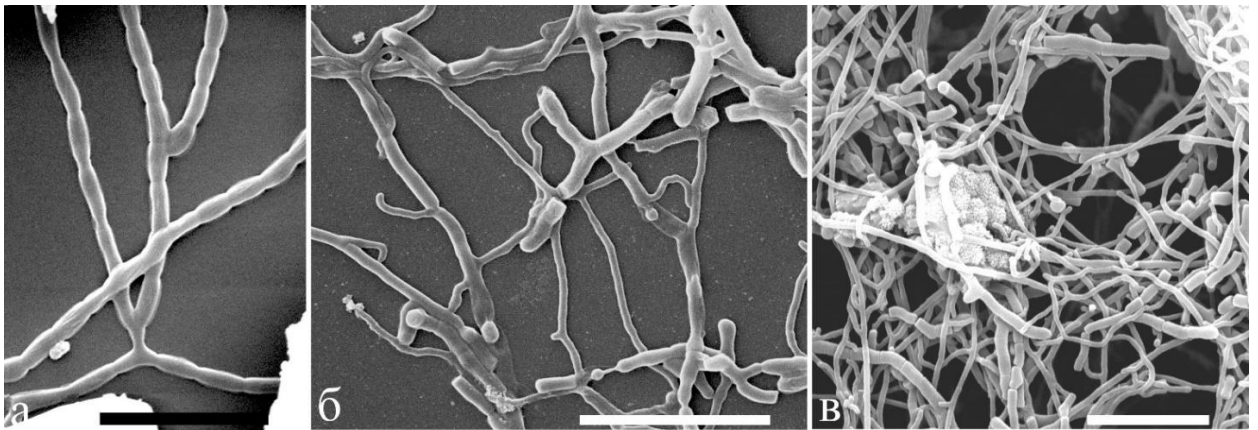


Рисунок 23 – Образование биопленки штаммом *Streptomyces* sp. 21А в среде с нитратом на 3 (а), 5 (б) и 7 (в) сутки культивирования. СЭМ. Масштаб – 5 мкм.

Таким образом, у клеток азотфиксирующей культуры *Rhizobium* sp. 2А при переходе к diazотрофному росту обнаружены морфологические изменения. При культивировании штамма в безазотистой среде, т.е. когда происходила фиксация азота, наблюдали увеличение диаметра клеток и продукции экзополисахарида как свидетельство наличия приспособительных механизмов защиты нитрогеназы от кислорода. Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А способны к росту только в среде с доступным азотом,

осуществляя преобразование растворимых форм неорганического азота в органический, в среде без азота клетки бактерий погибали в течение 7 дней.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе, с использованием комплекса методов, охарактеризованы численность, генетическое и таксономическое разнообразие бактерий круговорота азота в микробных сообществах нейстона, планктона и эпилимтона литоральной зоны оз. Байкал.

Сезонная динамика и пространственное распределение численности бактерий круговорота азота исследованы в разных биотопах и районах прибрежной зоны озера в течение трех лет с использованием методов культивирования. Количество денитрификаторов в водной толще было невысоким на протяжении всего периода исследований, в эпилимтных биопленках варьировало в зависимости от расположения станций. Сравнительный анализ численности аммонифицирующих бактерий показал, что их количество в водной толще и в биопленках выше в районах, подверженных антропогенному влиянию. С помощью корреляционного анализа выявлено, что количество исследуемых групп бактерий в прибрежных водах озера тесно связано с уровнем азотсодержащих минеральных соединений. Найдена значимая высокая положительная связь между численностью аммонифицирующих бактерий и концентрацией ионов аммония, а также высокая положительная и отрицательная связь количества денитрифицирующих бактерий с концентрацией нитратов и нитритов соответственно. Установлено, что основными факторами, объясняющими различия в количестве денитрифицирующих бактерий литорального эпилимтона оз. Байкал, были температура и концентрация общего азота в придонном слое воды и стехиометрическое соотношение N:P в биопленках. Показано, что меньшее количество денитрификаторов характерно для биопленок, испытывающих дефицит азота.

Методом высокопроизводительного секвенирования функциональных генов проведен сравнительный анализ разнообразия денитрифицирующих бактерий, населяющих поверхностный микрослой воды, водную толщу, придонный слой воды и биопленки каменистых субстратов литорали оз.

Байкал. Установлено, что основное разнообразие *nirK*-бактерий представлено порядками *Rhodobacterales* и *Hyphomicrobiales* класса *Alphaproteobacteria*, *nirS*-бактерий – порядками *Burkholderiales* и *Rhodocyclales* класса *Betaproteobacteria*, *Hyphomicrobiales*, *Rhodobacterales* и *Rhodospirillales* класса *Alphaproteobacteria*, *Steroidobacterales*, *Xanthomonadales*, *Pseudomonadales* и *Chromatiales* класса *Gammaproteobacteria*. Среди идентифицированных родов наиболее многочисленными были *Dechloromonas* (*Betaproteobacteria*, *Rhodocyclales*) и *Tabrizicola* (*Alphaproteobacteria*, *Rhodobacterales*) и встречались как в биопленочных обрастаниях, так и в воде.

С применением метагеномного подхода и высокопроизводительного секвенирования ампликонов гена 16S рРНК исследовано таксономическое разнообразие нитрифицирующих бактерий в эпилите и планктоне литоральной зоны оз. Байкал. Разнообразие аммонийокисляющих бактерий представлено семейством *Nitrosomonadaceae* (47 филотипов), нитритокисляющих бактерий – родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga* (*Gammaproteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospirota*. Среди окислителей аммония доминировали и встречались повсеместно бактерии Ellin6067 (27 филотипов), нитрита – бактерии рода *Nitrospira* (7 филотипов).

Из эпилитных биопленок выделены и охарактеризованы культуры денитрифицирующих бактерий. Полученные штаммы представлены видами *Pseudomonas gessardii* и *Pseudomonas veronii*, в геномах которых выявлен ген *nirS*, кодирующий основной фермент денитрификации – нитритредуктазу. Секвенирование генома *Pseudomonas veronii* 1СБ показало, что он включает гены *narG*, *nirS*, *norB*, *nosZ*, кодирующие ферменты, необходимые для осуществления полного процесса денитрификации, а также гены, ответственные за синтез ферментов диссимиляционного восстановления нитрата до аммония.

В лабораторных экспериментах с помощью культивирования и сканирующей электронной микроскопии показано влияние доступности азота

на рост азотфиксирующего штамма *Rhizobium* sp. 2A: в безазотистой среде при переходе культуры к diaзотрофному росту происходит образование полисахаридной капсулы вокруг клетки как свидетельство наличия приспособительных механизмов защиты нитрогеназы от воздействия кислорода.

ВЫВОДЫ

1. Численность культивируемых аммонификаторов в литорали оз. Байкал в 2017–2019 гг. колебалась в водной толще от 25 до 6×10^5 кл/мл, в эпилитных биопленках от $3,5 \times 10^3$ до $9,5 \times 10^6$ кл/см². В сезонной динамике их количество на порядок выше в июне в планктоне на станциях, подверженных антропогенному влиянию, а в сентябре в эпилитоне на фоновых станциях. Количество культивируемых денитрификаторов варьировало в водной толще от 0 до 60 кл/мл, в эпилитных биопленках от 6 до $2,5 \times 10^3$ кл/см². В сезонном аспекте их численность в планктоне значимо не различалась и была низкой на протяжении всего периода исследований, в эпилитоне варьировала в зависимости от расположения станций.

2. Пространственное распределение численности культивируемых аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилитоне литорали характеризуется неоднородностью по акватории оз. Байкал. В районах, испытывающих антропогенную нагрузку, где определяли повышенные концентрации азотсодержащих соединений, обнаружено увеличение численности исследуемых групп бактерий.

3. По данным анализа функциональных генов, денитрифицирующие бактерии *nirS*-типа в литорали оз. Байкал представлены классами *Betaproteobacteria* (65%), *Alphaproteobacteria* (28%) и *Gammaproteobacteria* (7%), *nirK*-типа – *Alphaproteobacteria* (99,96%), *Betaproteobacteria* (0,03%) и *Deltaproteobacteria* (0,01%). Наибольшее разнообразие *nirS*-содержащих бактерий отмечено в эпилитоне, *nirK*-содержащих – в придонной воде. Среди некультивируемых денитрификаторов доминировали бактерии родов *Dechloromonas* (*Betaproteobacteria*) и *Tabrizicola* (*Alphaproteobacteria*). Культивируемые денитрификаторы в эпилитоне представлены видами *Pseudomonas gessardii* и *Pseudomonas veronii* (*Gammaproteobacteria*).

4. Аммонийоокисляющие бактерии в эпилитоне и планктоне литорали оз. Байкал представлены семейством *Nitrosomonadaceae*, нитритоокисляющие бактерии – родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga*

(*Gammaproteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospina*. Наибольшее разнообразие нитрифицирующих бактерий характерно для эпилитона, наименьшее – для поверхностной воды.

5. Основными факторами, влияющими на количество денитрификаторов в эпилитных биопленках, являются температура и концентрация общего азота в придонной воде, а также молярное соотношение азота и фосфора в биомассе эпилитона. В планктоне количество аммонификаторов значимо связано с концентрацией ионов аммония, численность денитрификаторов зависит от концентрации нитратов и нитритов. Методом главных компонент показано, что видовое богатство денитрификаторов *nirK*-типа в водной толще зависит от концентрации нитратного азота.

6. Экспериментально установлено, что при культивировании азотфиксирующего штамма *Rhizobium* sp. 2A в безазотистой среде происходит увеличение диаметра клеток и продукции полисахарида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башенхаева М. В. Сообщества бактерий в период массового подледного развития динофлагеллят в озере Байкал / М. В. Башенхаева [и др.] // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 4. – С. 510–519.
2. Белых О. И. Обнаружение микроцистинов в цианобактериальных обрастаниях различных субстратов прибрежной зоны озера Байкал / О. И. Белых [и др.] // Вестник Московского Университета. Серия 16. Биология. – 2017. – Т. 72, № 4. – С. 262–269.
3. Берцова Ю. В. Дыхательная защита нитрогеназного комплекса у *Azotobacter vinelandii* / Ю. В. Берцова, О. В. Демин, А. В. Богачев // Успехи биологической химии. – 2005. – Т. 45. – С. 205–234.
4. Бикбулатов Э. С. Гидроксиламин и гидразин в водных экосистемах / Э. С. Бикбулатов, Е. М. Бикбулатова, И. Э. Степанова. – Рыбинск: Изд-во ОАО «Рыбинский дом печати», 2007. – 128 с.
5. Верховина В. А. Микробиальные процессы круговорота азота в Байкале / Микроорганизмы в экосистемах озер и водохранилищ. – Новосибирск: Наука, 1985. – С. 33–42.
6. Виноградский С. Н. Микробиология почвы. Проблемы и методы. 50 лет исследований. – М.: Изд-во АН СССР, 1952. – 792 с.
7. Виноградский С. Н. О роли микробов в общем круговороте жизни. – СПб.: тип. Имп. акад. наук, 1897. – 27 с.
8. Воробьева Т. Я. Микробиологические и гидрохимические аспекты круговорота азота в озерах Кенозерского национального парка / Т. Я. Воробьева [и др.] // Вестник САФУ. Естественные науки. – 2012. – № 4. – С. 13–21.
9. Вотинцев К. К. Гидрохимия озера Байкал. – Москва: Изд-во АН СССР, 1961. – 311 с.
10. Галазий Г. И. Байкал в вопросах и ответах. – 6-е изд., испр. и доп. – Иркутск, 2017. – 339 с.

11. Галачьянц А. Д. Поверхностный микрослой озера Байкал: таксономический состав, численность и активность бактериальных сообществ: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: / А. Д. Галачьянц; ИГУ. – Иркутск, 2017. – 21 с.
12. Гладких А. С. Сообщества цианобактерий в биопленках и планктоне литоральной зоны озера Байкал: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: / А. С. Гладких; ИГУ. – Иркутск, 2012. – 19 с.
13. Голованева А. Е. Микробиологическая трансформация азота в озере Халактырском (Камчатский край) / А. Е. Голованева, Н. А. Ступникова // МНИЖ. – 2020. – № 6. – С. 38–44.
14. Емцев В. Т. Микробиология: 5-е изд., перераб. и доп. / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – М.: Дрофа, 2005. – с. 445.
15. Земская Т. И. Состав микробных сообществ в осадках южного Байкала, содержащих Fe/Mn конкреции / Т. И. Земская [и др.] // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 3. – С. 291–302.
16. Калюжная О. В. Филогенетическое разнообразие микроорганизмов, ассоциированных с глубоководной губкой *Baikalospongia intermedia* / О. В. Калюжная, В. Б. Ицкович // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 7. – С. 765–776.
17. Ковадло А. С. Выделение и характеристика бактерий рода *Nurphomicrobium* из оз. Байкал / А. С. Ковадло // Известия Иркутского государственного университета. Серия Науки о Земле. – 2009. – Т. 1, № 1. – С. 75–83.
18. Кожов М. М. Биология озера Байкал. – Москва: Изд-во АН СССР, 1962. – 315 с.
19. Краснопеев А. Ю. Генетическое разнообразие бактериальных сообществ, ассоциированных с большими губками озера Байкал / А. Ю. Краснопеев [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология» – 2016. – Т. 16. – С. 3–14.
20. Кузнецов С. И. Микробиологические процессы круговорота углерода и азота в озерах / С. И. Кузнецов, А. И. Саралов, Т. Н. Назина. – М.: Наука, 1985. – 213 с.

21. Кузякина Т. И. Участие микроорганизмов в превращениях соединений азота в антропогенном водоеме (оз. Култучное, Камчатка) / Т. И. Кузякина, О. В. Хурина // Успехи современного естествознания. – 2007. – № 9. – С. 94–95.
22. Куликова Н. Н. Определение элементного состава бентосных макроводорослей для индикации качества воды мелководной зоны залива Лиственничный (Южный Байкал) / Н. Н. Куликова [и др.] // МНИЖ. – 2017. – Т. 66, № 12. – С. 166–176.
23. Лысак В. В. Физиология микроорганизмов: учеб.-метод. пособие / В. В. Лысак, Е. И. Игнатенко. – Минск: БГУ, 2016. – 80 с.
24. Максимова Э. А. Вертикальное распределение микробияльного планктона в течение 1969 г. в Южном Байкале / Э. А. Максимова, В. Н. Максимов // Микробиология. – 1972. – Т. 41, № 5. – С. 896–902.
25. Мальник В. В. Антропогенные изменения гидрохимических и санитарно-микробиологических показателей качества воды в притоках южного Байкала (зал. Лиственничный) / В. В. Мальник [и др.] // Вод. ресурсы. – 2019. – Т. 46, № 5. – С. 533–543.
26. Мальник В. В. Микробное сообщество биопленок на поверхности раздела фаз «вода-твердое тело» литоральной зоны оз. Байкал: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 2010 / В. В. Мальник; БГУ. – Улан-Удэ, 2010. – 22 с.
27. Никитин В. М. Бактерионейстон / В. М. Никитин // Экология Южного Байкала. – Иркутск: Изд-во Сиб. отд. АН СССР, 1983. – С. 68–77.
28. Павлова О. Н. Особенности распространения бактерий рода *Pseudomonas* в озере Байкал / О. Н. Павлова [и др.] // Сиб. экол. журн. – 2003. – № 3. – С. 267–272.
29. Парфенова В. В. Сравнительный анализ биоразнообразия бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал / В. В. Парфенова, А. С. Гладких, О. И. Белых // Микробиология. – 2013. – Т. 82, № 1. – С. 94–105.
30. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. вузов / Под ред. А. И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

- 31.Родина А. Г. Бактерии в продуктивности каменистой литорали оз. Байкал // Труды проблемных и тематических совещаний Зоол. ин-та АН СССР. – 1954. – Т. 2. – С. 172–201.
- 32.Родина А. Г. Методы водной микробиологии: практическое руководство. – М.; Л.: Наука, 1965. – 361 с.
- 33.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: / А. П. Романова. – Иркутск, 1961. – 22 с.
- 34.Россолимо Л. Л. Температурный режим озера Байкал // Труды Байкальской Лимнологической станции п. Листвянка. – Москва: АН СССР Сиб. отд-ние., 1957. – Т. 16. – 552 с.
- 35.Руководство к практическим занятиям по микробиологии: Практ. пособие / Под ред. Н. С. Егорова. – 2-е изд. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 215 с.
- 36.Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. Л.: Гидрометеиздат, 2009. – 1032 с.
- 37.Сакирко М. В. Динамика содержания растворенных газов и биогенных элементов в воде открытой литорали озера Байкал: Автореф. дис. ... канд. геогр. наук. – Санкт-Петербург, 2012. – 24 с.
- 38.Саралов А. И. Фиксация молекулярного азота в озерах разных типов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 1979 / А. И. Саралов; МГУ. – Москва, 1979. – 25 с.
- 39.Суслова М. Ю. Роль культивируемых микроорганизмов биопленок каменистых субстратов в системе самоочищения озера Байкал / М. Ю. Суслова [и др.] // Микробиология. – 2018. – Т. 87, № 6. – С. 718–726.
- 40.Сутурин А. Н. Роль антропогенных факторов в развитии экологического стресса в литорали оз. Байкал (акватория пос. Листвянка) / А. Н. Сутурин [и др.] // География и природ. ресурсы. – 2016. – № 6. – С. 34–53.
- 41.Теппер Е. З. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова. – Дрофа, 2004. – 256 с.

42. Умаров М. М. Микробиологическая трансформация азота в почве / М. М. Умаров, А. В. Кураков, А. Л. Степанов. – М.: ГЕОС, 2007. – 138 с.
43. Черницына С. М. Филогенетическое разнообразие микробных сообществ в донных отложениях Посольской банки, оз. Байкал / С. М. Черницына [и др.] // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 6. – С. 652–662.
44. Aakra A. Detailed phylogeny of ammonia-oxidizing bacteria determined by rDNA sequences and DNA homology values / A. Aakra [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2001. – V. 51. – P. 2021–2030.
45. Aalto S. L. Denitrifying microbial communities along a boreal stream with varying land-use / S. L. Aalto // Aquat. Sci. – 2019. – V. 81. – Art. № 59.
46. Achberger A. M. Microbial community structure of subglacial lake Whillans, west Antarctica / A. M. Achberger [et al.] // Front. Microbiol. – 2016. – V. 7. – Art. № 1457.
47. Afonina T. E. Dynamics of biogens to estimate ecological state of coastal waters of Southern Baikal / T. E. Afonina // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2021. – V. 666. – Art. № 042017.
48. Aichi M. Characterization of the Nitrate-Nitrite Transporter of the Major Facilitator Superfamily (the nrtP Gene Product) from the *Cyanobacterium Nostoc punctiforme* Strain ATCC 29133 / M. Aichi [et al.] // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 2006. – V. 70, № 11. – P. 2682–2689.
49. Alawi M. Cultivation of a novel cold-adapted nitrite oxidizing betaproteobacterium from the Siberian Arctic / M. Alawi [et al.] // ISME J. – 2007. – V. 1, № 3. – P. 256–264.
50. Alfreider A. Autotrophic carbon fixation strategies used by nitrifying prokaryotes in freshwater lakes / A. Alfreider [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2018. – V. 94, № 10. – Art. № fyy163.
51. Altmann D. In situ distribution and activity of nitrifying bacteria in freshwater sediment / D. Altmann [et al.] // Environ. Microbiol. – 2003. – V. 5, № 9. – P. 798–803.

52. Álvarez-Cobelas M. Spatial variability of denitrification along a nitrate-rich seepage chain of lakes (Ruidera Natural Park, Central Spain) / M. Álvarez-Cobelas [et al.] // *Limnetica*. – 2019. – V. 38, № 2. – P. 607–621.
53. Amann R. I. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer // *Microbiol. Rev.* – 1995. – V. 59, № 1. – P. 143–169.
54. Angel R. Evaluation of primers targeting the diazotroph functional gene and development of NifMAP—a bioinformatics pipeline for analyzing nifH amplicon data / R. Angel [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2018. – V. 9. – Art. № 703.
55. Arrigo K. R. High resolution study of the platelet ice ecosystem in McMurdo Sound, Antarctica: biomass, nutrient, and production profiles within a dense microalgal bloom / K. R. Arrigo [et al.] // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1995. – V. 127. – P. 1–3.
56. Ashton P. J. Nitrogen fixation and the nitrogen budget of a eutrophic impoundment / P. J. Ashton // *Water Res.* – 1981. – V. 15. – P. 823–833.
57. Auguet J. C. Partitioning of *Thaumarchaeota* populations along environmental gradients in high mountain lakes / J. C. Auguet, E. O. Casamayor // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2013. – V. 84. – P. 154–164.
58. Bartscht K. Evaluation of cell activity and of methods for the cultivation of bacteria from a natural lake community / K. Bartscht // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1999. – V. 28. – P. 249–259.
59. Behrendt U. Characterization of the N₂O-producing soil bacterium *Rhizobium azooxidifex* sp. nov. / U. Behrendt [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – V. 66, № 6. – P. 2354–2361.
60. Belykh O. I. Characterization of photoautotrophic microbial communities in the coastal water of Lake Baikal / Belykh O. I. [et al.] // *Limnol. Freshw. Biol.* – 2020. – № 4. – P. 966–968.
61. Bernal S. Differences in ammonium oxidizer abundance and N uptake capacity between epilithic and epipsammic biofilms in an urban stream / S. Bernal [et al.] // *Freshwater Science*. – 2018. – V. 37, № 1. – P. 13–22.

62. Bird C. Spatial distribution and transcriptional activity of an uncultured clade of planktonic diazotrophic γ -Proteobacteria in the Arabian Sea / C. Bird [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, № 4. – P. 2079–2085.
63. Bollmann A. Abundance and diversity of ammoniaoxidizing archaea and bacteria in sediments of trophic end members of the Laurentian Great Lakes, Erie and Superior / A. Bollmann, G. S. Bullerjahn, R. M. McKay // *PLoS ONE*. – 2014. – V. 9, № 5. – Art. № e97068.
64. Böllmann J. Comparison of different media for the detection of denitrifying and nitrate reducing bacteria in mesotrophic aquatic environments by the most probable number method / J. Böllmann, M. Martienssen // *Journal of Microbiological Methods*. – 2020. – V. 168. – Art. № 105808.
65. Both G. J. Enumeration of nitrite-oxidizing bacteria in grassland soils using a Most probable number technique: effect of nitrite concentration and sampling procedure / G. J. Both, S. Gerards, H. J. Laanbroek // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1990. – V. 74, № 4. – P. 277–285.
66. Braker G. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples / G. Braker, A. Fesefeldt, K. P. Witzel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64, № 10. – P. 3769–3775.
67. Braker G. Influence of temperature on the composition and activity of denitrifying soil communities / G. Braker, J. Schwarz, R. Conrad // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2010. – V. 73, № 1. – P. 134–148.
68. Braker G. Nitric oxide reductase (*norB*) genes from pure cultures and environmental samples / G. Braker, J. M. Tiedje // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2003. – V. 69, № 6. – P. 3476–3483.
69. Braker G. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities / G. Braker [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66, № 5. – P. 2096–2104.

70. Cabello-Yeves P. J. Genomes of novel microbial lineages assembled from the sub-ice waters of Lake Baikal / P. J. Cabello-Yeves [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2018. – V. 84, № 1. – P. 1–21.
71. Cabello-Yeves P. J. Microbiome of the deep Lake Baikal, a unique oxic bathypelagic habitat / P. J. Cabello-Yeves [et al.] // *Limnology and Oceanography*. – 2020. – V. 65, № 7. – P. 1471–1488.
72. Callahan B. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. Callahan [et al.] // *Nat. Methods*. – 2016. – V. 13. – P. 581–583.
73. Camargo J. A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment / J. A. Camargo, A. Alonso // *Environ. Int.* – 2006. – V. 32, № 6. – P. 831–849.
74. Carini S. A. Nitrification in Mono Lake, California: Activity and community composition during contrasting hydrological regimes / S. A. Carini, S. B. Joye // *Limnol. Oceanogr.* – 2008. – V. 53. – P. 2546–2557.
75. Castellano-Hinojosa A. Denitrification and biodiversity of denitrifiers in a high-mountain Mediterranean Lake / A. Castellano-Hinojosa [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – Art. № 1911.
76. Chen G. Y. Diversity and abundance of ammoniaoxidizing bacteria in eutrophic and oligotrophic basins of a shallow Chinese lake (Lake Donghu) / G. Y. Chen, S. L. Qiu, Y. Y. Zhou // *Res. Microbiol.* – 2009. – V. 160. – P. 173–178.
77. Chen Q. Effects of environmental factors on denitrifying bacteria and functional genes in sediments of Bohai Sea, China / Q. Chen [et al.] // *Marine Pollution Bulletin*. – 2020. – V. 160. – Art. № 111621.
78. Chen Y. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave / Y. Chen [et al.] // *ISME J.* – 2009. – V. 3, № 9. – P. 1093–1104.
79. Chicano T. M. Structural and functional characterization of the intracellular filament-forming nitrite oxidoreductase multiprotein complex / T. M. Chicano [et al.] // *Nat. Microbiol.* – 2021. – V. 6. – P. 1129–1139.

80. Chourey K. Environmental proteomics reveals early microbial community responses to biostimulation at a uranium- and nitrate-contaminated site / K. Chourey [et al.] // *Proteomics*. – 2013. – V. 13. – P. 2921–2930.
81. Collier J. L. Diversity of urea-degrading microorganisms in open-ocean and estuarine planktonic communities / J. L. Collier, K. M. Baker, S. L. Bell // *Environ Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 12. – P. 3118–3131.
82. Daims H. A new perspective on microbes formerly known as nitrite-oxidizing bacteria / H. Daims, S. Lücker, M. Wagner // *Trends Microbiol.* – 2016. – V. 24. – P. 699–712.
83. Daims H. Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria / H. Daims [et al.] // *Nature*. – 2015. – V. 528, № 7583. – P. 504–509.
84. Daims H. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants / H. Daims [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67, № 11. – P. 5273–5284.
85. DeLuca T. H. Frequent fire alters nitrogen transformations in ponderosa pine stands of the inland northwest / T. H. DeLuca, A. Sala. // *Ecology*. – 2006. – V. 87, № 10. – P. 2511–2522.
86. Deng D. Denitrifying Microbial Communities in Heavy-Metal-Contaminated Paddy Soils near Electronic-Waste Processing Centers / D. Deng [et al.] // *Water Air Soil Pollut.* – 2018. – V. 229, № 10. – Art. № 318.
87. Diaz M. C. Sponge-mediated nitrification in tropical benthic communities / M. C. Diaz, B. B. Ward // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1997. – V. 156. – P. 97–107.
88. Dugdale R. Nitrogen fixation in lakes / R. Dugdale [et al.] // *Science*. – 1959. – V. 130, № 3379. – P. 859–860.
89. Fahrbach M. *Steroidobacter denitrificans* gen. nov., sp. nov., a steroidal hormone-degrading gammaproteobacterium / M. Fahrbach [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – V. 58. – P. 2215–2223.
90. Fakruddin M. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective / M. Fakruddin, K. S. Mannan, S. Andrews // *ISRN Microbiology*. – 2013. – Art. № 703813

91. Fan H. Denitrification and the denitrifier community in coastal microbial mats / H. Fan, H. Bolhuis, L. J. Stal // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2015. – V. 91. – Art. № fiu033.
92. Flett R. J. Nitrogen fixation in Canadian Precambrian shield lakes / R. J. Flett [et al.] // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1980. – V. 37. – P. 494–505.
93. Franche C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants / C. Franche, K. Lindstrom, C. Elmerich // *Plant and Soil.* – 2009. – V. 321. – P. 35–59.
94. Francis C. A. Ubiquity and diversity of ammoniaoxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean / C. A. Francis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – P. 14683–14688.
95. Freeman W. M. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential / W. M. Freeman, S. J. Walker, K. E. Vrana // *BioTech.* – 1999. – V. 26, № 1. – P. 112–122, 124–125.
96. Freitag T. E. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils / T. E. Freitag [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71. – P. 8323–8334.
97. French E. Ecophysiological characterization of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria from freshwater / E. French [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78, № 16. – P. 5773–5780.
98. Fuchsman C. A. Metabolic strategies of free-living and aggregate-associated bacterial communities inferred from biologic and chemical profiles in the Black Sea suboxic zone / C. A. Fuchsman [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2011. – V. 78. – P. 586–603.
99. Gaby J. C. A comprehensive aligned nifH gene database: a multipurpose tool for studies of nitrogen-fixing bacteria / J. C. Gaby, D. H. Buckley // *Database (Oxford).* – 2014. – Art. № bau001.
100. Gaby J. C. A comprehensive evaluation of PCR primers to amplify the nifH gene of nitrogenase / J. C. Gaby, D. H. Buckley // *Plos One.* – 2012. – V. 7, № 7. – Art. № e42149.

101. Galachyants A. D. Bacterioneuston in Lake Baikal: abundance, spatial and temporal distribution / A. D. Galachyants [et al.] // Int. J. Environ. Res. Publ. Health. – 2018. – V. 15. – Art. № 2587.
102. Gamble T. N. Numerically Dominant Denitrifying Bacteria from World Soils / T. N. Gamble, M. R. Betlach, J. M. Tiedje // Applied and environmental microbiology. – 1977. – V. 33, № 4. – P. 926–939.
103. Ginzinger D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream / D. G. Ginzinger // Exp. Hematol. – 2002. – V. 30, № 6. – P. 503–512.
104. Graf D. R. H. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions / D. R. H. Graf, C. M. Jones, S. Hallin // PloS One. – 2014. – V. 9, № 12. – Art. № e114118.
105. Griffin B. M. Nitrite, an electron donor for anoxygenic photosynthesis / B. M. Griffin, J. Schott, B. Schink // Science. – 2007. – V. 316. – Art. № 1870.
106. Hallin S. PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria / S. Hallin, P. E. Lindgren // Applied and Environmental Microbiology. – 1999. – V. 65, № 4. – P. 1652–1657.
107. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis pro-gram for Windows 95/98/NT / T. Hall // Nucleic Acids Symp. Ser. – 1999. – V. 41. – P. 95 – 98.
108. Han H. Enhanced Nitrous Oxide Production in Denitrifying *Dechloromonas aromatica* Strain RCB Under Salt or Alkaline Stress Conditions / H. Han [et al.] // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 1203.
109. Hanson R. B. Pelagic Sargassum community metabolism: Carbon and nitrogen / R. B. Hanson // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1977. – V. 29, № 2. – P. 107–118.
110. Hardy R. W. F. The acetylene–ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation / R. W. F. Hardy [et al.] // Plant Physiol. – 1968. – V. 43. – P. 1185–1207.

111. Helen D. Highly diverse nirK genes comprise two major clades that harbour ammonium-producing denitrifiers / D. Helen [et al.] // BMC Genomics. – 2016. – V. 17. – P. 1–13.
112. Henriques M. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method / M. Henriques, A. Silva, J. Rocha // Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. – 2007. – P. 586–593.
113. Henry S. Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils / S. Henry [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – V. 72 – P. 5181–5189.
114. Herbert R. A. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems / R. A. Herbert // FEMS Microbiol. Rev. – 1999. – V. 23, № 5. – P. 563–590.
115. Hillebrand H. The nutrient stoichiometry of benthic microalgal growth: Redfield proportions are optimal / H. Hillebrand, U. Sommer // Limnol. Oceanogr. – 1999. – V. 44, № 2. – P. 440–446.
116. Hirota R. Transcriptional analysis of the multicopy hao gene coding for hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas* sp. strain ENI-11 / R. Hirota [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2006. – V. 70, № 8. – P. 1875–1881.
117. Hong Y. Residence of habitat-specific anammox bacteria in the deep-sea subsurface sediments of the South China Sea: analyses of marker gene abundance with physical chemical parameters / Y. Hong [et al.] // Microb. Ecol. – 2011. – V. 62. – Art. № 36e47.
118. Horne A. J. Nitrogen fixation in an oligotrophic, saline desert lake: Pyramid Lake, Nevada / A. J. Horne, D. L. Galat // Limnol. Oceanogr. – 1985. – V. 30, № 6. – P. 1229–1239.
119. Horne A. J. Nitrogen fixation in Clear Lake, California. I. Seasonal variation and the role of heterocysts / A. J. Horne, C. R. Goldman // Limnol. Oceanogr. – 1972. – V. 17, № 5. – P. 678–692.

120. Hou J. Predominance of ammonia-oxidizing archaea and nirK-gene-bearing denitrifiers among ammonia-oxidizing and denitrifying populations in sediments of a large urban eutrophic lake (Lake Donghu) / J. Hou [et al.] // *Can. J. Microbiol.* – 2013. – V. 59, № 7. – P. 456–464.
121. Hou J. Shifts between ammoniaoxidizing bacteria and archaea in relation to nitrification potential across trophic gradients in two large Chinese lakes (Lake Taihu and Lake Chaohu) / J. Hou [et al.] // *Water Res.* – 2013. – V. 47, № 7. – P. 2285–2296.
122. Huang T. L. Nitrogen Removal Characteristics of a Newly Isolated Indigenous Aerobic Denitrifier from Oligotrophic Drinking Water Reservoir, *Zoogloea* sp. N299 / T. L Huang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – V. 16, №5. – P. 10038–10060.
123. Huelsenbeck J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck, F. Ronquist // *Bioinformatics.* – 2001. – V. 17, № 8. – P. 754–755.
124. Hüpeden J. Relative abundance of *Nitrotoga* in a biofilter of a cold freshwater aquaculture plant appears to be stimulated by slightly acidic pH / J. Hüpeden [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2016. – V. 82. – P. 1838 –1845.
125. Ishii K. Enrichment and physiological characterization of a cold-adapted nitriteoxidizing *Nitrotoga* sp. from an eelgrass sediment / K. Ishii [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2017. – V. 83. – Art. № e00549-17.
126. Jaeschke A. 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs / A. Jaeschke [et al.] // *FEMS microbiology ecology.* – 2009. – V. 67, № 3. – P. 343–350.
127. Jetten M. S. M. Anaerobic ammonium oxidation by marine and freshwater planctomycete-like bacteria / M. S. M. Jetten [et al.] // *Appl. Microbiol. Biot.* – 2003. – V. 63. – P. 107–114.

128. Jetten M. S. M. Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria / M. S. M. Jetten [et al.] // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2009. – V. 44. – Art. № 65e84.
129. Jetten M. S. M. The anaerobic oxidation of ammonium / M. S. M. Jetten [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. – 1998. – V. 22 – P. 421–437.
130. Jiang R. Use of Newly Designed Primers for Quantification of Complete Ammonia-Oxidizing (Comammox) Bacterial Clades and Strict Nitrite Oxidizers in the Genus *Nitrospira* / R. Jiang [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2020. – V. 86, № 20. – Art. e01775-20.
131. Ji B. Aerobic denitrification: A review of important advances of the last 30 years / B. Ji [et al.] // Biotechnol. Bioproc. – 2015. – V. 20. – P. 643–651.
132. Jones C. M. Phylogenetic analysis of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide respiratory enzymes reveal a complex evolutionary history for denitrification / C. M. Jones [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2008. – V. 25. – P. 1955–1966.
133. Jones J. G. Differences in microbial decomposition processes in profundal and littoral lake sediments, with particular reference to the nitrogen cycle / J. G. Jones, B. M. Simon // J. Gen. Microbiol. – 1981. – V. 123, № 2. – P. 297–312.
134. Jorgensen S. L. Correlating microbial community profiles with geochemical data in highly stratified sediments from the Arctic Mid-Ocean Ridge / S. L. Jorgensen [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2012. – V. 109. – P. E2846–E2855.
135. Junier P. Habitat partitioning of denitrifying bacterial communities carrying nirS or nirK genes in the stratified water column of Lake Kinneret, Israel / P. Junier [et al.] // Aquat. Microb. Ecol. – 2008. – V. 51, № 2. – P. 129–140.
136. Kahlert M. Spatial and temporal variation in the biomass and nutrient status of epilithic algae in Lake Erken, Sweden / M. Kahlert [et al.] // Freshwater biology. – 2002. – V. 47, № 7. – P. 1191–1215.

137. Kayashima T. Real-Time PCR for Rapidly Detecting Aniline-Degrading Bacteria in Activated Sludge / T. Kayashima [et al.] // *Chemosphere*. – 2013. – V. 91. – P. 1338–1343.
138. Khodzher T. V. Current chemical composition of Lake Baikal water / T. V. Khodzher [et al.] // *Island Waters*. – 2017. – V. 7, № 3. – P. 250–258.
139. Khodzher T. V. Methods for monitoring the chemical composition of Lake Baikal water / T. V. Khodzher [et al.] // *Novel Methods for Monitoring and Managing Land and Water Res. in Siberia* / Eds. L. Mueller, A. K. Sheudshen, F. Eulenstein. – Cham: Springer, 2016. – P. 113–132.
140. Kim O-S. Distribution of denitrifying bacterial communities in the stratified water column and sediment–water interface in two freshwater lakes and the Baltic Sea / O-S. Kim [et al.] // *Aquat. Ecol.* – 2011. – V. 45. – P. 99–112.
141. King D. The influence of nitrate concentration upon the end-products of nitrate dissimilation by bacteria in anaerobic salt marsh sediment / D. King, D. B. Nedwell // *FEMS Microbiol Lett.* – 1985. – V. 31. – P. 23–28.
142. Kinnunen M. *Nitrotoga* is selected over *Nitrospira* in newly assembled biofilm communities from a tap water source community at increased nitrite loading / M. Kinnunen [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2017. – V. 19. – P. 2785–2793.
143. Kits K. D. Kinetic analysis of a complete nitrifier reveals an oligotrophic lifestyle / K. D. Kits [et al.] // *Nature*. – 2017. – V. 549. – P. 269–272.
144. Knapp C. W. Spatial heterogeneity of denitrification genes in a highly homogenous urban stream / C. W. Knapp [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – V. 43. – P. 4273–4279.
145. Knowles R. Denitrification / R. Knowles // *Microbiol. Rev.* – 1982. – V. 46, № 1. – P. 43–70.
146. Kojima H. Identification of major planktonic sulfur oxidizers in stratified freshwater lake / H. Kojima [et al.] // *PLoS One*. – 2014. – V. 9 – Art. № e93877.

147. Koops H. P. Distribution and ecophysiology of the nitrifying bacteria emphasizing cultured species / H. P. Koops, A. Pommerening-Roser // FEMS Microbiol. Ecol. – 2001. – V. 37, № 1. – P. 1–9.
148. Kortelainen P. CH₄, CO₂ and N₂O supersaturation in 12 Finnish lakes before and after ice-melt / P. Kortelainen [et al.] // Verh. Internat. Verein. Limnol. – 2000. – V. 27. – P. 1410–1414.
149. Kowalchuk G. A. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments / G. A. Kowalchuk [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – V. 63, № 4. – P. 1489–1497.
150. Kravtsova L. C. Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal / L. C. Kravtsova [et al.] // J. Great Lakes Res. – 2014. – V. 40, № 2. – P. 441–448.
151. Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Mol. Biol. Evol. – 2016. – V. 33, № 7 – P. msw054.
152. Kumar S. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // Mol. Biol. Evol. – 2018. – V. 35. – P. 1547–1549.
153. Lakatos G. Structural Characterization of Periphyton in Kis-Balaton / G. Lakatos // Protecting System Bericht. – 1991. – V. 77. – P. 147–156.
154. Lalucat J. Biology of *Pseudomonas stutzeri* / J. Lalucat [et al.] // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2006. – V. 70, № 2. – P. 510–547.
155. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing / D. J. Lane // Nucleic acid techniques in bacterial systematics; eds E. Stackebrandt, M. Goodfellow. – New York: John Wiley and Sons, 1991. – P. 115–175.
156. Lebedeva E. V. Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone / E. V. Lebedeva [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 2005. – V. 54. – P. 297–306.

157. Levine S. N. A numerical model of nitrogen fixation and its application to Lake Valencia, Venezuela / S. N. Levine, W. M. Lewis // *Freshwater Biol.* – 1987. – V. 17. – P. 265–274
158. Liao X. Fire effects on nitrogen cycling in native and restored calcareous Wetlands / X. Liao, P. W. Inglett, K. S. Inglett // *Fire Ecology.* – 2013. – V. 9, № 1. – P. 6–20.
159. Li D. Bacterial community characteristics under long-term antibiotic selection pressures / D. Li [et al.] // *Water Res.* – 2011. – V. 45. – P. 6063–6073.
160. Liess A. Atmospheric nitrogen deposition may intensify phosphorus limitation of shallow epilithic periphyton in unproductive lakes / A. Liess, S. Drakare, M. Kahlert // *Freshwater Biology.* – 2009. – V. 54. – P. 1759–1773.
161. Li J. Diversity and distribution of nirK-harboring denitrifying bacteria in the water column in the Yellow River estuary / J. Li [et al.] // *Microbes. Environ. JSME.* – 2014. – V. 29. – P. 107–110.
162. Lins U. Magnetotaxis / U. Lins, D. A. Bazylinski // *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*; eds Moselio Schaechter. – Academic Press, 2009. – P. 229–241.
163. Liu S. Different Bacterial Communities Involved in Peptide Decomposition between Normoxic and Hypoxic Coastal Waters / S. Liu, B. Wawrik, Z. Liu // *Frontiers in microbiology.* – 2017. – V. 8. – P. 353.
164. Lomakina A. V. Microbial communities of the discharge zone of oil- and gas-bearing fluids in low-mineral Lake Baikal / A. V. Lomakina [et al.] // *Microbiology.* – 2014. – V. 83, № 3. – P. 278–287.
165. Lücker S. *Nitrotoga*-like bacteria are previously unrecognized key nitrite oxidizers in full-scale wastewater treatment plants / S. Lücker [et al.] // *ISME J.* – 2015. – V. 9. – P. 708–720.
166. Luo G. Soil carbon, nitrogen, and phosphorus cycling microbial populations and their resistance to global change depend on soil C:N:P stoichiometry / G. Luo [et al.] // *mSystems.* – 2020. – V. 5, № 3. – Art. № 5:e00162-20.

167. Lyautey E. Abundance, activity and structure of denitrifier communities in phototrophic river biofilms (River Garonne, France) / E. Lyautey [et al.] // *Hydrobiologia*. – 2013. – V. 716. – P. 177–187.
168. Mague T. N. Biological nitrogen fixation in the Great Lakes / T. N. Mague, R. N. Burris // *BioScience*. – 1973. – V. 32. – P. 236–239.
169. Mardanov A. V. Genome of a Novel Bacterium “*Candidatus Jettenia ecosi*” reconstructed from the metagenome of an anammox bioreactor / A. V. Mardanov [et al.] // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – V. 10. – Art. № 2442.
170. Martemyanov V. V. Phenological asynchrony between host plant and gypsy moth reduces insect gut microbiota and susceptibility to *Bacillus thuringiensis* / V. V. Martemyanov [et al.] // *Ecol. Evol.* – 2016. – V. 6, № 20. – P. 7298–7310.
171. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads / M. Martin // *EMBnet J.* – 2011. – V. 17, № 1. – P. 10–12.
172. McIlroy S. J. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems / S. J. McIlroy [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2016. – V.18. – P. 50–64.
173. Melton E. D. High spatial resolution of distribution and interconnections between Fe- and N-redox processes in profundal lake sediments / E. D. Melton [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2014. – V. 16, № 10. – P. 3287–3303.
174. Merbt S. N. Photoinhibition on natural ammonia oxidizers biofilm populations and implications for nitrogen uptake in stream biofilms / S. N. Merbt [et al.] // *Limnol. Oceanogr.* – 2017. – V. 62. – P. 364–375.
175. Michotey V. Comparison of methods for quantification of cytochrome cd1-denitrifying bacteria in environmental marine samples / V. Michotey, V. Mejean, P. Bonin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 1564–1571.
176. Ming H. Diversity and Abundance of Denitrifying Bacteria in the Sediment of a Eutrophic Estuary / H. Ming [et al.] // *Geomicrobiology Journal*. – 2021. – V. 38, № 3. – P. 199–209.

177. Mitamura O. In situ measurement of the urea decomposition rate and its turnover rate in the Pacific Ocean / O. Mitamura, Y. Saijo // *Mar. Biol.* – 1980. – V. 58, № 2. – P. 147–152.
178. Mobley H. L. T. Molecular biology of microbial ureases / H. T. Mobley, M. D. Island, R. P. Hausinger // *Microbiol. Rev.* – 1995. – V. 59, № 3. – P. 451–480.
179. Mosier A. C. Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary / A. C. Mosier, C. A. Francis // *Environmental Microbiology Reports.* – 2010. – V. 2. – P. 667–676.
180. Mukherjee M. Identification, enumeration and diversity of nitrifying planktonic archaea and bacteria in trophic end members of the Laurentian Great Lakes / M. Mukherjee [et al.] // *Journal of Great Lakes Research.* – 2016. – V. 42, № 1. – P. 39–49.
181. Murtagh F. Comments on “Parallel algorithms for hierarchical clustering and cluster validity” / F. Murtagh // *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* – 1992. – V. 14. – P. 1056–1057.
182. Nogales B. Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA / B. Nogales [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68, № 10. – P. 5017–5025.
183. Oksanen J. The vegan package / J. Oksanen [et al.] // *Community ecology package.* – 2007. – V. 10. – P. 631–637.
184. Oliver J. D. The Viable but Nonculturable State in Bacteria / J. D. Oliver // *Journal of Microbiology.* – 2005. – V. 43. – P. 93–100.
185. Olson J. B. Ubiquity of heterotrophic diazotrophs in marine microbial mats / J. B. Olson, R. W. Litaker, H. W. Paerl // *Aquatic Microbial Ecology.* – 1999. – V. 19, № 1. – P. 29–36.
186. Ouyang Y. Shortterm nitrogen fertilization affects microbial community composition and nitrogen mineralization functions in an agricultural soil / Y. Ouyang, J. M. Norton // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2020. V. 86. – Art. № e02278-19.

187. Ozersky T. Nutrient limitation of benthic algae in Lake Baikal, Russia / T. Ozersky [et al.] // *Freshwater Science*. – 2018. – V. 37, № 3. – P. 472–482.
188. Pachiadaki M. G. Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation / M. G. Pachiadaki [et al.] // *Science*. – 2017. – V. 358 – P. 1046–1051.
189. Palacin-Lizarbe C. The DNRA-Denitrification Dichotomy Differentiates Nitrogen Transformation Pathways in Mountain Lake Benthic Habitats / C. Palacin-Lizarbe [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2019. – V. 10. – Art. № 1229.
190. Park B. J. Cultivation of autotrophic ammonia-oxidizing archaea from marine sediments in co-culture with sulfur-oxidizing bacteria / B. J. Park [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2010. – V. 76, № 22. – P. 7575–7587.
191. Pester M. nxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira* / M. Pester [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2014. – V. 16. – P. 3055–3071.
192. Philippot L. Denitrification in pathogenic bacteria: for better or worst? / L. Philippot // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13. – P. 191–192.
193. Philippot L. Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils / L. Philippot [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – V. 68, № 12. – P. 6121–6128.
194. Philippot L. Use of functional genes to quantify denitrifiers in the environment / L. Philippot // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – V. 34. – P. 101–103.
195. Phillips C. J. Quantitative Analysis of Ammonia Oxidising Bacteria Using Competitive PCR / C. J. Phillips, E. A. Paul, J. I. Prosser // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2000. – V. 32 – P. 167–175.
196. Pile A. J. Trophic effects of sponge feeding within Lake Baikal's littoral zone. 2. Sponge abundance, diet, feeding efficiency, and carbon flux / A. J. Pile [et al.] // *Limnology and Oceanography*. – 1997. – V. 42. – P. 178–184.
197. Pishgar R. Denitrification performance and microbial versatility in response to different selection pressures / R. Pishgar [et al.] // *Bioresour. Technol.* – 2019. – V. 281. – P. 72–83.

198. Pjevac P. AmoA-Targeted Polymerase Chain Reaction Primers for the Specific Detection and Quantification of Comammox *Nitrospira* in the Environment / P. Pjevac [et al.] // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. – Art. № 1508.
199. Poly F. Comparison of nifH in soils and microenvironments with contrasting properties / F. Poly [et al.] // *Appl. Environ. Microb.* – 2001. – V. 67. – P. 2255–2262.
200. Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging / D. Posada // *Mol. Biol. Evol.* – 2008. – V. 25. – P. 1253–1256.
201. Preheim S. P. Distribution-based clustering: using ecology to refine the operational taxonomic unit / S. P. Preheim [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 79, № 21. – P. 6593–6603.
202. Purkhold U. 16S rRNA and amoA-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia oxidizing isolates: extension of the data set and proposal of a new lineage within the nitrosomonads / U. Purkhold [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53. – P. 1485–1494.
203. Purkhold U. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys / U. Purkhold [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 5368–5382.
204. Qin P. Ecological stoichiometry in benthic food webs: Effect of light and nutrients on periphyton food quantity and quality in lakes / P. Qin [et al.] // *Limnology and Oceanography.* – 2007. – V. 52. – P. 1728–1734.
205. Quast C. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools / C. Quast [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – P. D590–D596.
206. Rambaut A. Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. / A. Rambaut [et al.] // *Syst. Biol.* – 2018. – V. 67. – P. 901–904.

207. Rathsack K. Comparative study of different methods for analyzing denitrifying bacteria in fresh water ecosystems / K. Rathsack, J. Böllmann, M. Martienssen // *J. Water Resour. Prot.* – 2014. – V. 6, №6. – P. 609–617.
208. Raymond J. The natural history of nitrogen fixation / J. Raymond [et al.] // *Mol. Biol. Evol.* – 2004. – V. 21, № 3. – P. 541–554.
209. Reed S. C. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective / S. C. Reed, C. C. Cleveland, A. R. Townsend // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* – 2011. – V. 42. – P. 489–512.
210. Ribot M. Nitrogen processing and the role of epilithic biofilms downstream of a wastewater treatment plant / M. Ribot [et al.] // *Freshwater Science.* – 2012. – V. 31, № 4. – P. 1057–1069.
211. Richardson D. J. The Prokaryotic Nitrate Reductases / D. J. Richardson, R. J. M. van Spanning, J. S. Ferguson // *Biol. Nitrogen Cycle*; eds H. Bothe, S. J. Ferguson, W. E. Newton. – Elsevier Science, 2007. – P. 21–36.
212. Rissanen A. J. Spatial and temporal variation in denitrification and in the denitrifier community in a boreal lake / A. J. Rissanen, M. Tirola, A. Ojala // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2011. – V. 64. – P. 27–40.
213. Rotthauwe J. H. The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations / J. H. Rotthauwe, K. P. Witzel, W. Liesack // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63, № 12. – P. 4704–4712.
214. Rysgaard S. Anaerobic N₂ production in Arctic sea ice / S. Rysgaard, R. N. Glud // *Limnol. Oceanogr.* – 2004. – V. 49. – P. 86–94.
215. Ryuda N. Visualization and Direct Counting of Individual Denitrifying Bacterial Cells in Soil by nirK-Targeted Direct in Situ PCR / N. Ryuda [et al.] // *Microbes and Environments.* – 2010. – V. 26, № 1. – P. 74–80.
216. Saarenheimo J. Genetic and environmental controls on nitrous oxide accumulation in lakes / J. Saarenheimo [et al.] // *PLOS ONE.* – 2015. – V. 10. – Art. № e0121201.

217. Sabra W. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase / W. Sabra [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – V. 66, № 9. – P. 4037–4044.
218. Sakadevan K. Impact of Heavy Metals on Denitrification in Surface Wetland Sediments Receiving Wastewater / K. Sakadevan, H. Zheng, H. J. Bavor // Water Sci. Technol. – 1999. – V. 40, № 3. – P. 349–355.
219. Sánchez C. Redundant roles of *Bradyrhizobium oligotrophicum* Cu-type (NirK) and cd1-type (NirS) nitrite reductase genes under denitrifying conditions / C. Sánchez, K. Minamisawa // FEMS Microbiol. Lett. – 2018. – V. 365, № 5. – P. 1–7.
220. Sanli K. Metagenomic sequencing of marine periphyton: taxonomic and functional insights into biofilm communities / K. Sanli [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – Art. № 1192.
221. Scala D. J. Nitrous oxide reductase (nosZ) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three nosZ genes from marine sediments / D. J. Scala, L. J. Kerkhof // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – V. 162, № 1. – P. 61–68.
222. Schlesinger W. H. On the fate of anthropogenic nitrogen / W. H. Schlesinger // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – V. 106, № 1. – P. 203–208.
223. Schloss P. D. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P. D. Schloss [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75. – P. 7537–7541.
224. Schubert C. J. Anaerobic ammonium oxidation in a tropical freshwater system (Lake Tanganyika) / C. J. Schubert [et al.] // Environ. Microbiol. – 2006. – V. 8, № 10. – P. 1857–1863.
225. Schulz S. A comparative study of most probable number (MPN)-PCR vs. real-time-PCR for the measurement of abundance and assessment of diversity of alkB homologous genes in soil / S. Schulz [et al.] // J. Microbiol. Methods – 2010. – V. 80, № 3. – P. 295–298.

226. Shapleigh J. The Denitrifying Prokaryotes. – New York: Springer, 2006. – P. 769–792.
227. Shiro Y. Structural basis for nitrous oxide generation by bacterial nitric oxide reductases / Y. Shiro [et al.] // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2012. – V. 367, № 1593. – P. 1195–1203.
228. Short S. M. Quantitative analysis of *nifH* genes and transcripts from aquatic environments / S. M. Short, J. P. Zehr // *Methods Enzymol.* – 2005. – V. 397 – P. 380–394.
229. Simon J. The unprecedented *nos* gene cluster of *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome c nitrous oxide reductase / J. Simon [et al.] // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 569. – P. 7–12.
230. Smith C. J. Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples / C. J. Smith [et al.] // *Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 8, № 5. – P. 804–815.
231. Smith G. B. Isolation and characterization of a NO₂ - reductase gene and its use as a probe for denitrifying bacteria / G. B. Smith, J. M. Tiedje // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1992. – V. 58, № 1. – P. 376–384.
232. Smith J. M. Ammonium uptake by phytoplankton regulates nitrification in the sunlit ocean / J. M. Smith, F. P. Chavez, C. A. Francis // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – Art. № e108,173.
233. Song B. Nitrite reductase genes in halobenzoate degrading denitrifying bacteria / B. Song, B. B. Ward // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2003. – V. 43, № 3. – P. 349–357.
234. Stein L. Y. The nitrogen cycle / L. Y. Stein, M. G. Klotz // *Current. Biology.* – 2016. – V.26, № 3. – P. R94-R98.
235. Steppe T. F. Nitrogenase activity and *nifH* expression in a marine intertidal microbial mat / T. F. Steppe, H. W. Paerl // *Microb. Ecol.* – 2005. – V. 49. – P. 315–324.

236. Strous M. Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome / M. Strous [et al.] // *Nature*. – 2006. – V. 440, № 7085. – P. 790–794.
237. Steward G. F. Vertical distribution of nitrogen fixing phylotypes in a meromictic hypersaline lake / G. F. Steward [et al.] // *Microb. Ecol.* – 2004. – V. 47, № 1. – P. 30–40.
238. Suchard M. A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 / M. A. Suchard [et al.] // *Virus Evol.* – 2018. – V 4, № 1. – Art. № vey016.
239. Su J. J. Comparison of aerobic denitrification under pure oxygen atmosphere by *Thiosphaera pantotropha* ATCC 35512 and *Pseudomonas stutzeri* SU2 newly isolated from the activated sludge of a piggery wastewater treatment system / J. J. Su, B. Y. Liu, C. Y. Liu // *Journal of Applied Microbiology*. – 2001. – V. 90, № 3, P. 457–462.
240. Tao Z. A novel filter-type constructed wetland for secondary effluent treatment: Performance and its microbial mechanism / Z. Tao [et al.] // *Bioresource Technology*. – 2023. – V. 380. – Art. № 129075.
241. Tarhriz V. Emended description of the genus *Tabrizicola* and the species *Tabrizicola aquatica* as aerobic anoxygenic phototrophic bacteria / V. Tarhriz [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2019. – V. 112, № 8. – P. 1169–1175.
242. Tarhriz V. *Tabrizicola aquatica* gen. nov. sp. nov., a novel alphaproteobacterium isolated from Qurugöl Lake nearby Tabriz city, Iran / V. Tarhriz [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2013. – V. 104, № 6. – P. 1205–1215.
243. Taylor H. B. Composition, diversity, and activity of aerobic ammonia-oxidizing Bacteria and Archaea in the intertidal sands of a grand strand South Carolina beach / H. B. Taylor, H. D. Jr. Kurtz // *Microbiology open*. – 2020. – V. 3. – Art. № e1011.

244. Teissier S. Detailing biogeochemical N budgets in riverine epilithic biofilms / S. Teissier [et al.] // *Journal of the North American Benthological Society*. – 2007. – V. 26, № 2. – P. 178–190.
245. Teissier S. Impact of an urban centre on the nitrogen cycle processes of epilithic biofilms during a summer low-water period / S. Teissier [et al.] // *River Res. Applic.* – 2002. – V. 18. – P. 21–30.
246. Teissier S. Simultaneous assessment of nitrification and denitrification on freshwater epilithic biofilms by acetylene block method / S. Teissier, M. Torre // *Water Research*. – 2002. – V. 36, № 15. – P. 3803–3811.
247. Terai H. Taxonomic study and distribution of denitrifying bacteria in Lake Kizaki / H. Terai // *Jap. J. Limnol.* – 1979. – V. 40, № 2. – P. 81–92.
248. Thomsen T. R. Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge / T. R. Thomsen, Y. Kong, P. H. Nielsen // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2007. – V. 60, № 3. – P. 370–382.
249. Throbäck I. N. Reassessing PCR primers targeting nirS, nirK and nosZ genes for community surveys of Denitrifying bacteria with DGGE / I. N. Throbäck [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2004. – V. 49. – P. 401–417.
250. Timoshkin O. A. Coastal zone of the world's great lakes as a target field for interdisciplinary research and ecosystem monitoring: Lake Baikal (East Siberia) / O. A. Timoshkin // *Limnology and Freshwater Biology*. – 2018. – №1. – P. 81–97.
251. Timoshkin O. A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? / O. A. Timoshkin [et al.] // *JGLR*. – 2016. – V. 42, № 3. – P. 487–497.
252. Tiren T. Denitrification measurement in lakes / T. Tiren, J. Thorin, H. Nommik // *Acta agr. Scand.* – 1976. – V. 26, № 3. – P. 175–184.
253. Tison D. L. Nitrogen fixation in lakes of the Lake Washington drainage basin / D. L. Tison, F. E. Palmer, J. T. Staley // *Water Res.* – 1977. – V. 11 – P. 843–847.

254. Turner S. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis / S. Turner [et al.] // J. Eukaryot. Microbiol. – 1999. – V. 46, № 4. – P. 327–338.
255. Urakawa H. Characterization and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining / H. Urakawa [et al.] // Environ Microbiol. – 2006. – V. 8, № 5. – P. 787–803.
256. Ushiki N. Isolation of *Nitrospira* belonging to sublineage II from a wastewater treatment plant / N. Ushiki [et al.] // Microbes Environ. – 2013. – V. 28. – P. 346–353.
257. van de Graaf A. A. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process / A. A. van de Graaf [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 4. – P. 1246–1251.
258. van Kessel M. A. H. J. Complete nitrification by a single microorganism / M. A. H. J. van Kessel [et al.] // Nature. – 2015. – V. 528, № 7583. – P. 555–559.
259. Verhille S. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters / S. Verhille [et al.] // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1999. – V. 49, № 4. – P. 1559–1572.
260. Vila-Costa M. Nitrogen-Cycling Genes in Epilithic Biofilms of Oligotrophic High-Altitude Lakes (Central Pyrenees, Spain) / M. Vila-Costa [et al.] // Microb. Ecol. – 2014. – V. 68. – P. 60–69.
261. von Wintzingerode F. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis / F. von Wintzingerode, U. B. Göbel, E. Stackebrandt // FEMS Microbiol. Rev. – 1997. – V. 21. – P. 213–229.
262. Wang J. Reverse-transcriptional gene expression of anammox and ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soybean and rice paddy soils of Northeast China / J. Wang [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – V. 98. – Art. № 2675e2686.

263. Wang P.-H. Anaerobic and aerobic cleavage of the steroid core ring structure by *Steroidobacter denitrificans* / P.-H. Wang [et al.] // J. Lipid Res. – 2013. – V. 54. – P. 1493–1504.
264. Ward B. B. Diversity of culturable denitrifying bacteria / B. B. Ward // Arch. Microbiol. – 1995. – V. 163 – P. 167–175.
265. Wardle D. A. The charcoal effect in boreal forest: mechanisms and ecological consequences / D. A. Wardle, O. Zackrisson, M. C. Nilsson // Oecologia. – 1998. – V.115. – P. 419–426.
266. Watson S. W. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: A chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium / S. W. Watson [et al.] // Arch. Microbiol. – 1986. – V. 144. – P. 1–7.
267. Weiten A. Complete Genomes of the Anaerobic Degradation Specialists *Aromatoleum petrolei* ToN1T and *Aromatoleum bremense* PbN1T / A. Weiten [et al.] // Microb. Physiol. – 2021. – V. 31, № 1. – P. 16–35.
268. Wetzel R. G., Likens G. E. Limnological Analyses. – New York: Springer, 2000. – 430 p.
269. Wetzel R. G. Limnology: Lake and River Ecosystems. – San Diego: Academic Press, 2001. – 488 p.
270. Yang H. Water quality characteristics along the course of the Huangpu River (China) / H. Yang [et al.] // J. Environ. Sci. – 2007. – V. 19. – P. 1193–1198.
271. Yoshie S. Salinity decreases nitrite reductase gene diversity in denitrifying bacteria of waste water treatment systems / S. Yoshie [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – V. 70, № 5. – P. 3152–3157.
272. Yoshinari T. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria / T. Yoshinari, R. Knowles // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1976. – V. 69. – P. 705–710.
273. Young J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In G. Stacey, R. H. Burris, H. J. Evans (ed.), Biological nitrogen fixation. New York: Chapman and Hall. – 1992. – P. 43–86.

274. Yuan H. Characteristics of microbial denitrification under different aeration intensities: Performance, mechanism, and co-occurrence network / H. Yuan [et al.] // *Sci. Total Environ.* – 2021. – V. 754. – Art. № 141965
275. Zackrisson O. Key ecological function of charcoal from wildfire in the boreal forest / O. Zackrisson, M. C. Nilsson, D. A. Wardle // *Oikos.* – 1996. – V. 77. – P. 10–19.
276. Zani S. Expression of *nifH* genes in natural microbial assemblages in Lake George, New York, detected by reverse transcriptase PCR / S. Zani [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. – P. 3119–3124.
277. Zehr J. P. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes / J. P. Zehr, M. T. Mellon, S. Zani // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1998. – V. 64, № 9. – P. 3444–3450.
278. Zehr J. P. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison / J. P. Zehr // *Environ. Microbiol.* – 2003. – № 5. – P. 539–554.
279. Zehr J. P. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* / J. P. Zehr, L. A. McReynolds // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1989. – V. 55 – P. 2522–2526.
280. Zhang T. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants / T. Zhang, M.-F. Shao, L. Ye // *ISME J.* – 2011. – V. 6. – P. 1137–1147.
281. Zhao X. Y. Environmental factors influencing the distribution of ammonifying and denitrifying bacteria and water qualities in 10 lakes and reservoirs of the North-east, China / X. Y. Zhao [et al.] // *Microb. Biotechnol.* – 2015. – V. 8, № 3. – P. 541–548.
282. Zhao Y. Biofilm: A strategy for the dominance of comammox *Nitrospira* / Y. Zhao [et al.] // *Journal of Cleaner Production.* – 2022. – V. 363. – Art. № 132361.

283. Zhong X. Factors influencing heavy metal availability and risk assessment of soils at typical metal mines in Eastern China / X. Zhong [et al.] // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – V. 400. – Art. № 123289.
284. Zhou S. Characteristics and Driving Factors of the Aerobic Denitrifying Microbial Community in Baiyangdian Lake, Xiong'an New Area / S. Zhou [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8, № 5. – Art. № 714.
285. Zumft W. G. Cell biology and molecular basis of denitrification / W. G. Zumft // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997. – V. 61 – P. 533–616.
286. Zumft W. G. Nitric oxide reductase from *Pseudomonas stutzeri*: Primary structure and gene organization of a novel bacterial cytochrome bc complex / W. G. Zumft, C. Braun, H. Cuyper // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – V. 219, № 1-2. – P. 481–490.
287. Zumft W.G. Nitric oxide reductases of prokaryotes with emphasis on the respiratory, heme-copper oxidase type / W. G. Zumft // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2005. – V. 99, № 1. – P. 194–215.
288. Zumft W.G. Respiratory transformation of nitrous oxide (N₂O) to dinitrogen by Bacteria and Archaea / W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck // *Advances in Microbial Physiology*. – 2007. – V. 52. – P. 107–227.
289. Zumsteg A. Characterizing bacterial communities in paper production-troublemakers revealed / A. Zumsteg, S. K. Urwyler, J. Glaubitz // *Microbiologyopen*. – 2017. – V. 6, № 4. – Art. № e00487.