

На правах рукописи



ПОДЛЕСНАЯ

Галина Владимировна

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

1.5.16 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Борок, 2024

Работа выполнена в лаборатории водной микробиологии в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель: **Белых Ольга Ивановна**
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, доцент, заведующая лабораторией водной микробиологии ФГБУН «Лимнологический институт» СО РАН

Официальные оппоненты: **Горленко Владимир Михайлович**
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории экологии и геохимической деятельности микроорганизмов, ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, г. Москва

Кондратьева Любовь Михайловна
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории гидрологии и гидрогеологии, ХФИЦ ДВО РАН, Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, г. Хабаровск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Улан-Удэ

Защита состоится «__» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.034.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН» по адресу: 152742, Ярославская обл., Некоузский район, п. Борок, д. 109. Тел./факс: +7 (48547) 24042, e-mail: dissovet@ibiw.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН и на сайте <http://www.ibiw.ru>, с авторефератом – в сети Интернет на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru/>) и ИБВВ РАН (<http://www.ibiw.ru/>)

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Л. Г. Корнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, 2007). Биогеохимический круговорот азота представляет собой ключевой механизм формирования качества воды. От концентрации азотсодержащих соединений зависит общая продуктивность водоема (Кузнецов, 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-Ninojosa 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 исследований 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 экологических 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 охарактеризовано таксономическое разнообразие бактерий круговорота азота в различных биотопах оз. Байкал. С помощью сканирующей электронной микроскопии показаны морфологические и ультраструктурные особенности выделенных бактериальных культур при переходе к diazotrophic growth.

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 NCBI 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы дана общая характеристика круговорота азота в природе и основных его этапов: азотфиксации, нитрификации, анаэробного окисления аммония, денитрификации и аммонификации. Проведен анализ методов, применяемых для изучения численности, разнообразия и функциональной активности микроорганизмов, участвующих в превращениях азотсодержащих соединений. Рассмотрены отечественные и зарубежные исследования процессов круговорота азота в водоемах озерного типа, а также история изучения круговорота азота на оз. Байкал.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Определение химических компонентов в пробах воды и эпилитных биопленках выполняли сотрудники лаборатории гидрохимии и химии атмосферы ЛИН СО РАН по стандартным методам.

Учет бактерий, участвующих в круговороте азота, проводили на селективных средах по общепринятым в микробиологии методам. Численность денитрификаторов определяли в жидкой среде Гильтая, аммонификаторов – в



Рисунок 1 – Карта станций отбора проб: 1 – напротив пос. Листвянка, 2 – напротив пос. Большие Коты, 3 – напротив пос. Большое Голоустрое, 4 – вблизи бух. Ая, 5 – в прол. Ольхонские Ворота, 6 – бух. Пещерка, 7 – около м. Елохин, 8 – г. Северобайкальск

пептонной воде (Родина, 1965). Для полученных данных рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение. Количественные данные по распределению денитрификаторов в августе были \log_{10} трансформированы.

Для выявления зависимости между признаками 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.

Чистые культуры денитрифицирующих бактерий получали на агаризованной среде Гильтая методом истощающего посева до отдельных колоний. Для описания морфологических признаков клеток бактерий применяли метод световой микроскопии. Физиолого-биохимические свойства штаммов определяли, тестируя их на наличие

ферментов: каталаза, цитохромоксидаза, щелочная фосфатаза, протеаза, амилаза, лецитиназа (Руководство..., 1983; Практикум..., 2005).

Определение влияния источника азота на рост культур проводили, используя модифицированный метод стекловосрастания и жидкую среду Эшби с сахарозой: безазотистую и с добавлением KNO_3 . Подготовленные препараты (стекла) наблюдали в сканирующий электронный микроскоп FEI Company Quanta 200 («FEI Company», США).

Для **выделения ДНК** из природных проб и чистых культур использовали метод фенол-хлороформной экстракции и набор «ДНК-сорб В» («АмплиСенс», Россия) соответственно. **Аmplification, лигирование и трансформацию** ампликонов для секвенирования по Сэнгеру осуществляли по стандартным методикам. Ампликоны для секвенирования на платформе MiSeq (Illumina, США) очищали с помощью CleanMag DNA («Евроген», Россия). Библиотеки из ампликонных смесей готовили с помощью набора Nextera XT kit (Illumina, США).

Секвенирование проводили в компании «Синтол» (г. Москва, Россия) и в ЦКП «Геномика» СО РАН (г. Новосибирск, Россия). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *nirK* депонированы в базу данных GenBank

(NCBI) под номерами MK460600-MK460761. Данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования, депонированы в архив SRA (NCBI) под номером PRJNA613961.

Биоинформатический анализ и статистическая обработка данных. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов 16S рРНК, *nirS* 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, объединяли в операционные таксономические единицы (ОТЕ) и рассчитывали индексы биоразнообразия в программе mothur 1.39.5 (<http://www.mothur.org>). Дерево аминокислотных последовательностей фрагмента гена *nirK* конструировали с помощью программы MrBayes 3.2.6 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). Филогенетическое дерево фрагментов генов 16S рРНК и *nirS* строили методом объединения ближайших соседей в программе MEGA X (Kumar et al., 2018). Иерархический кластерный анализ проводили методом UPGMA, применяя пакеты phyloseq v. 1.21.0 и phangorn v. 2.2.0, реализованные в программе R 3.2.4.

Высокопроизводительное секвенирование. Оценку качества библиотек ампликонов проводили с помощью программы Fast-QC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), праймеры и химерные последовательности удаляли с помощью программы cutadapt v. 1.14 (Martin, 2011). Дальнейшую обработку последовательностей выполняли в программе DADA2 (Callahan et al., 2016).

Фрагменты последовательностей гена 16S рРНК выравнивали, группировали в ОТЕ (дистанция 0,03) и таксономически идентифицировали 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 строили в программе MEGA X 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 и идентифицировали с использованием алгоритма BLASTp в базе данных NCBI-NR. Нуклеотидные последовательности кластеризовали при 95% уровне сходства для дальнейшего анализа. Деревья для функциональных генов конструировали методом байесовской цепи Маркова Монте-Карло (MCMC) в программе BEAST v. 1.10.4 (Suchard et al., 2018) с моделью замен HKY + 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 программирования R. Для анализа альфа- и бета-разнообразия применяли данные со случайной частичной выборкой по наименьшему значению. Альфа-разнообразию анализировали с помощью индексов Chao1 и Шеннона, бета-разнообразию – методом UPGMA. Анализ избыточности (RDA) выполняли в R, используя пакет vegan v. 2.6-4.

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. Б. Голоустное, бух. Пещерка, м. Елохин и г. Северобайкальск (вблизи городского пляжа). Глубина озера в месте отбора составляла 1-1,5 м. Бух. 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 напротив пос. Листвянка (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 напротив пос. Листвянка (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).

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. ($p < 0,05$). 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 значимых

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 – $2,5\pm 0,5\times 10^5$ и $6,0\pm 1,8\times 10^5$ соответственно. Средняя численность АБ (кл/мл) в водной толще литоральной зоны озера за трехлетний период исследований в июне составила $5,0\pm 2,8\times 10^2$, в сентябре – $6,0\pm 1,3\times 10^2$.

В эпилимне высокую численность АБ отмечали на станциях, подверженных интенсивной антропогенной нагрузке: напротив пос. Листвянка, пос. Б. Голоустное, г. Северобайкальск. Максимальные количества АБ (кл/см²) выявлены в июне 2017 г. на станции вблизи г. Северобайкальск – $9,5\pm 1,5\times 10^6$. 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 $3,4\pm 1,2\times 10^4$ кл/см² и $2,6\pm 1,4\times 10^5$ кл/см² соответственно.

Численность денитрифицирующих бактерий.

В водной толще численность денитрифицирующих бактерий (ДБ) была не высокой на всех станциях – от единиц до десятков кл/мл. 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 значимых различий не выявлено ($p>0,05$). Среднегодовая численность ДБ (кл/мл) в водной толще литоральной зоны озера в июне составила 13 ± 4 , в сентябре – 7 ± 6 .

В эпилимнитных биопленках количество ДБ варьировало в зависимости от расположения станций по акватории озера, как в сезонном, так и в межгодовом аспекте. Максимальную численность ДБ (кл/см²) в эпилимне определяли в июне на станциях вблизи г. Северобайкальск – $2,5\pm 0,9\times 10^3$ (2017 г.) и в районе м. Елохин – $2,5\pm 0,5\times 10^3$ (2019 г.). Среднегодовая численность ДБ (кл/см²) за период 2017–2019 гг. в пробах эпилимнитных биопленок в июне составила $7,9\pm 2,4\times 10^2$, в сентябре – $4,8\pm 0,5\times 10^2$.

Корреляционный анализ микробиологических и гидрохимических параметров. Показана высокая связь численности АБ и концентрации аммония ($r = 0,77, p=0,05$) в пробах воды на станции м. Елохин, а также высокая прямая связь количества ДБ с нитратами ($r = 0,75, p=0,05$) и обратная с нитритами ($r = -0,76, p=0,05$) в пробах воды на станции в бух. Пещерка.

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

Для определения экологических факторов, объясняющих различия в количестве денитрифицирующих бактерий литорального эпилимна оз. Байкал, в августе 2019 г. 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 эпилимнитных биопленок в исследуемых районах различалась значительно ($p<0,05$). На станциях напротив пос. Листвянка и в прол. Ольхонские

Ворота биомасса биопленок на квадратный сантиметр площади камня больше по показателям сырого веса, содержание хлорофилла «а» также было выше. Содержание углерода, азота и фосфора в эпилитоне исследуемых станций значимо не различалось, как и молярное соотношение элементов С:Р и С:N ($p>0,05$), однако различалось молярное соотношение азота и фосфора N:Р ($p<0,05$). 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 наблюдали в большей концентрации в биопленках у пос. Листвянка.

Концентрации общего органического фосфора и азота в пробах нефилтрованной придонной воды выше на станциях напротив пос. Листвянка и 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.

Количество денитрифицирующих бактерий в биопленках исследуемых районов различалось как по наиболее вероятному числу клеток на площадь в 1 см^2 , так и при пересчете на грамм влажного веса биопленки ($p<0,05$). Наибольших значений численность достигала в прол. Ольхонские Ворота – 6×10^4 кл/см², что составляет максимальное значение для эпилитных биопленок оз. Байкал. Минимальные значения обнаружены на станции у пос. Б. Коты – 6 кл/см². Между биомассой биопленки и количеством денитрификаторов значимой связи не выявлено.

Показано, 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 биопленки и средними значениями стехиометрии N:Р 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. В биопленках на станциях напротив пос. Б. Голоустное и прол. Ольхонские Ворота выявлено 4,0 и 4,7 \log_{10} кл/г денитрификаторов и молярное соотношение азота к фосфору равное 30 и 21 соответственно. В биопленках станций напротив пос. Листвянка и пос. Б. Коты – 3,0 и 2,5 \log_{10} кл/г денитрификаторов и молярное соотношение азота и фосфора – 12 и 17 соответственно (рис. 2) Ранее в экспериментах выявили, что молярное соотношение N:Р биомассы равное 13 и менее указывало на дефицит азота, а соотношение равное 22 и более – на дефицит фосфора (Hillebrand, Sommer, 1999). Таким образом, денитрифицирующие бактерии более распространены в эпилитных биопленках, не испытывающих дефицит азота, определенный по стехиометрии азота и фосфора в биомассе эпилитного сообщества.

Положительной взаимосвязи между количеством денитрифицирующих бактерий эпилитных биопленок и концентрацией нитратного азота в придонной воде не выявлено. Возможным поставщиком нитратов в эпилитной биопленке может быть нитрификация – сопряженный процесс (Teissier et al., 2002). К более

редко учитываемым факторам, отрицательно влияющим на денитрифицирующее сообщество, можно отнести содержание тяжелых металлов (Deng et al. 2018). Концентрация тяжелых металлов в эпилитных биопленках в среднем составила около 70 мг/кг и не показала значимой связи с численностью культивируемых денитрификаторов ($r = -0,4, p=0,63$).

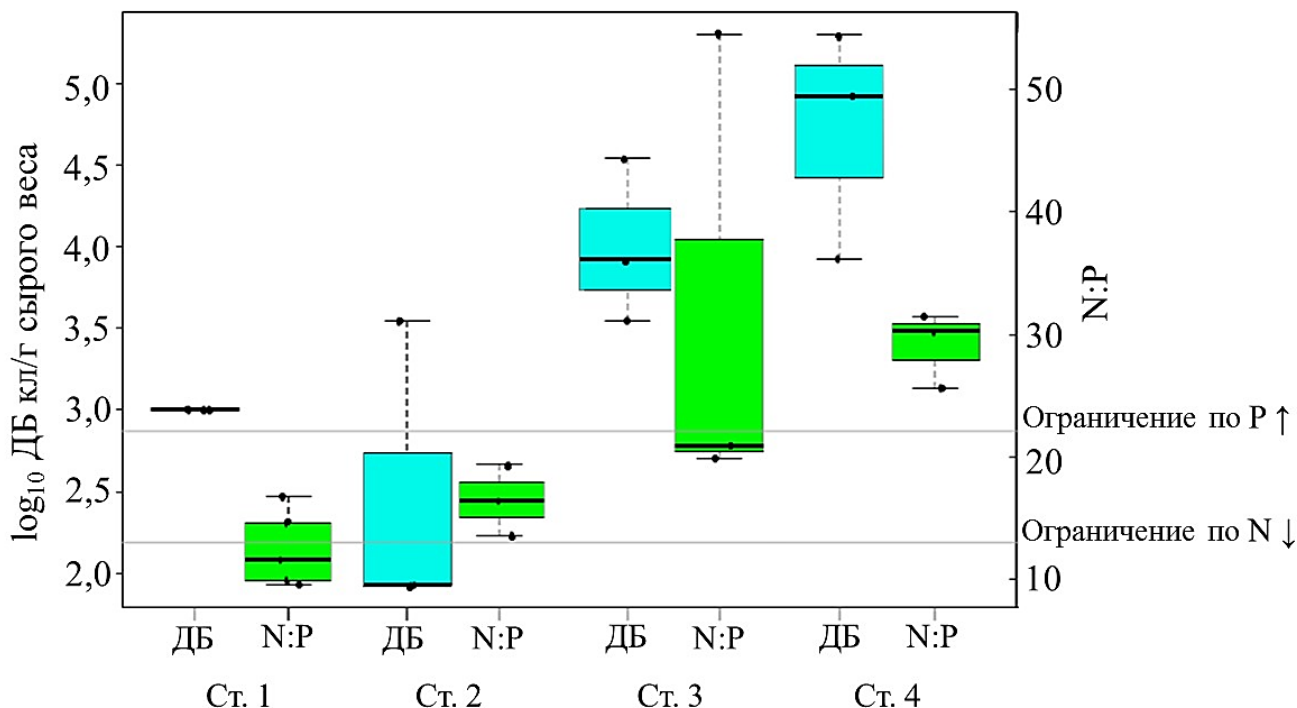


Рисунок 2 – Распределение денитрифицирующих бактерий (ДБ) кл/г сырого веса и стехиометрического соотношения N:P на станциях исследования: Ст. 1 – напротив пос. Листвянка, Ст. 2 – напротив пос. Б. Коты, Ст. 3 – напротив пос. Б. Голоустное, Ст. 4 – пролив Ольхонские Ворота. «Боксплоты» охватывают 2 и 3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

Таким образом, из четырех исследуемых районов литорали Байкала, наибольший потенциал денитрификации наблюдался на станции в прол. Ольхонские Ворота и, вероятно, он отражал высокую интенсивность денитрификации. Концентрации общего азота и фосфора в придонных водах у пос. Листвянка были сходны с таковыми в прол. Ольхонские Ворота, однако численность денитрификаторов в эпилитных биопленках оказалась значительно ниже. Как показали наблюдения, частично данный факт может быть связан с ингибированием денитрификации низкой температурой воды и скоплением таких микроэлементов, как Cr, Zn, Cu, Pb. Кроме того, баланс азота и фосфора в эпилите 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 биопленках

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, изолированных на разных станциях, охарактеризованы физиолого-биохимические свойства (табл. 1) и проведена идентификация на основе анализа последовательностей генов 16S рРНК и *nirS*. 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.

Таблица 1 – Физиолого-биохимические свойства чистых культур денитрифицирующих бактерий

| Штамм | Станция отбора проб биопленок | Фосфатаза | Амилаза | Лецитиназа | Протеаза | |
|-------|-------------------------------|-----------|---------|------------|----------|----|
| | | | | | к | ж |
| 1СБ | г. Северобайкальск | + | 0 | 0 | 0 | |
| 11СБ | г. Северобайкальск | - | 0 | 8 | 22 | 30 |
| 1МУ | о. 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 (–).

По результатам BLAST-анализа фрагмента гена 16S рРНК все штаммы гомологичны представителям рода *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*). Филогенетический анализ показал, что морфотип 11SB (штаммы 11СБ, 1МУ, 4БУС, 1БУП, 5Г и БП2-2) группируется на дереве с типовым штаммом *Pseudomonas gessardii* CIP 105469. Филотип 1SB (штамм 1СБ) формирует совместный кластер с типовым штаммом *Pseudomonas veronii* CIP 104663 (рис. 3).

Способность изолятов к денитрификации подтверждена с помощью амплификации генов (*nirS*, *nirK*), кодирующих нитритредуктазу. Во всех культурах обнаружен ген *nirS*.

Для штамма *Pseudomonas* sp. 1СБ секвенирован геном и с использованием базы данных Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) найдены интересные участки метаболизма азота. 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*).

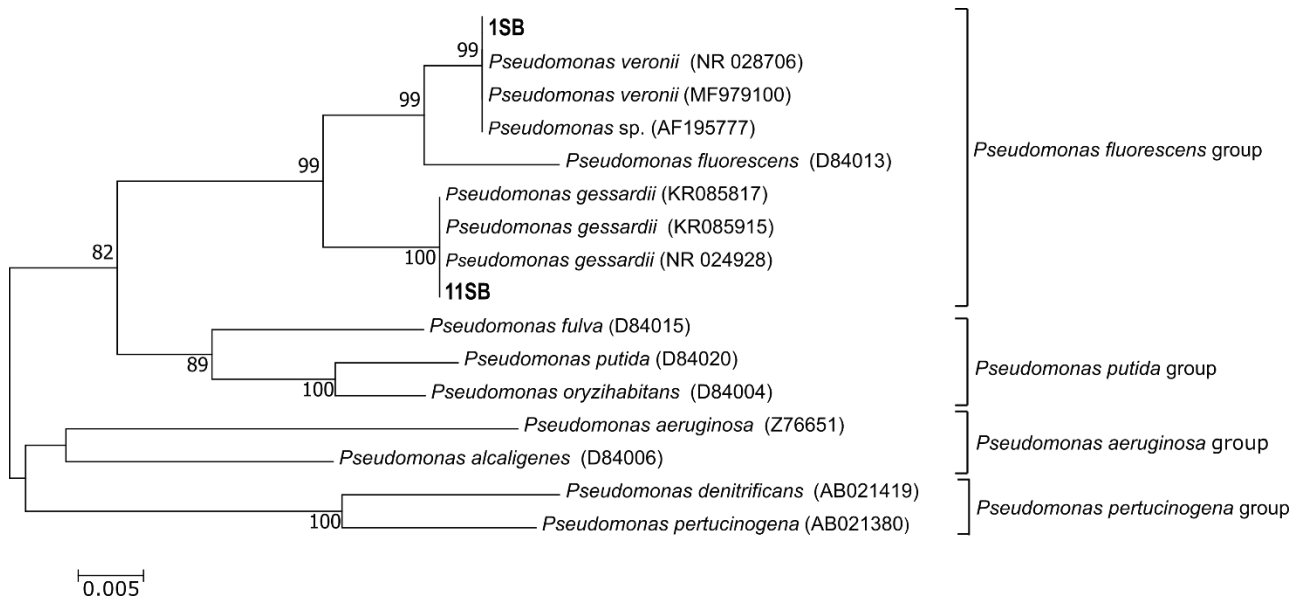


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, построенное по фрагментам гена 16S рРНК для представителей рода *Pseudomonas*. Последовательности штаммов, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом. Бутстреп-анализ проведен для 1000 реплик, масштаб соответствует 5 заменам на 1000 п.н.

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

Для выявления разнообразия денитрифицирующих бактерий в эпилите 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-G10 подняты с глубины 1 м в июне и сентябре: G7 и G8 в районе пос. Листвянка; G9 и G10 в районе г. Северобайкальск. 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* (табл. 2).

Таблица 2 – 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 |

BLAST-анализ показал, что для всех клонированных последовательностей ближайшими родственниками преимущественно были некультивируемые бактерии из разных местообитаний со сходством от 78 до 100%. Наибольшим

видовым богатством, согласно индексам разнообразия, отличались образцы, отобранные вблизи пос. Б. Голоустное, г. Северобайкальск; наименьшим – около пос. Листвянка (табл. 2).

Иерархический кластерный анализ сообществ денитрификаторов из различных сред обитания демонстрирует формирование отдельных групп последовательностей в зависимости от физико-химических параметров окружающей среды (рис. 4). Байкальские последовательности группируются в отдельный кластер с последовательностями из воды, осадков и биопленок других озер. Следует отметить, что последовательности из проб акваторий 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 (Timoshkin et al., 2018).

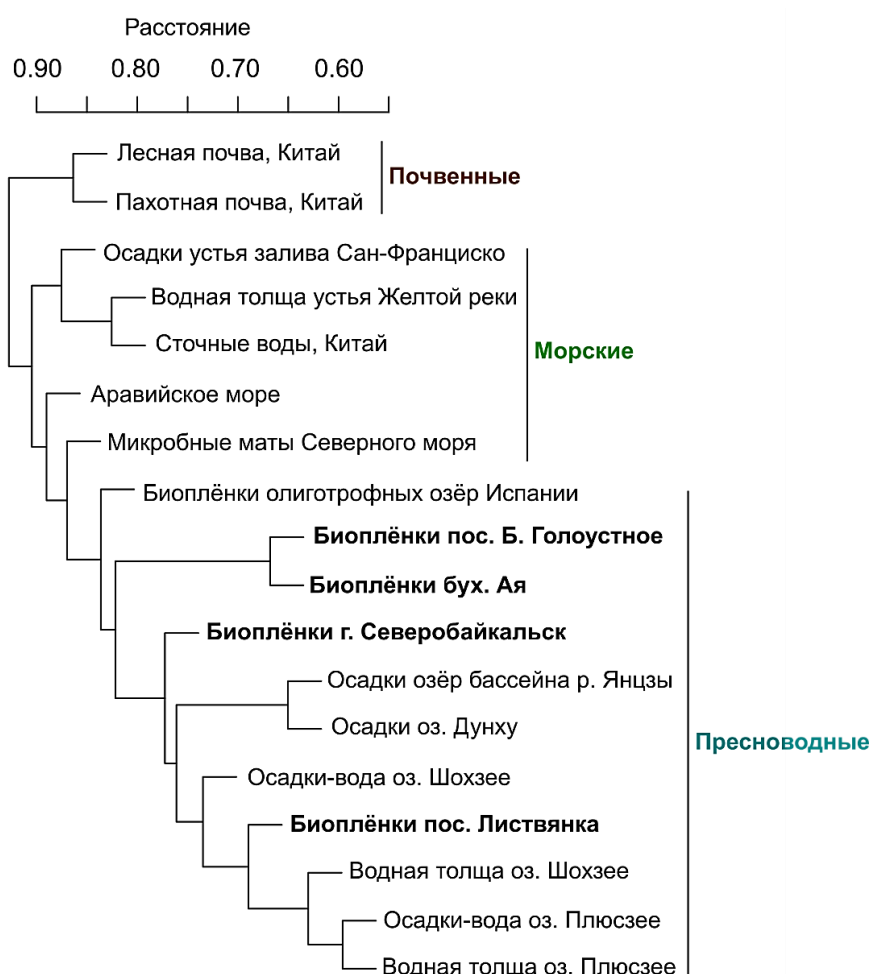


Рисунок 4 – Дендрограмма *nirK*-сообществ, построенная с использованием иерархического кластерного анализа (hclust) методом UPGMA. Сообщества денитрификаторов из оз. Байкал выделены жирным шрифтом

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.

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. 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. Голоустное (G1).

В изученных бактериальных сообществах к доминирующим филам (доля более 1% от общего числа последовательностей) отнесены *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Acidobacteria*. Микробиомы эпилитных биопленок сильно отличались от сообществ 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 *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. Доля *Gamma*proteobacteria и *Actinobacteria* сопоставима в микробиомах биопленок, поверхностного микрослоя и водной толщи (рис. 5).

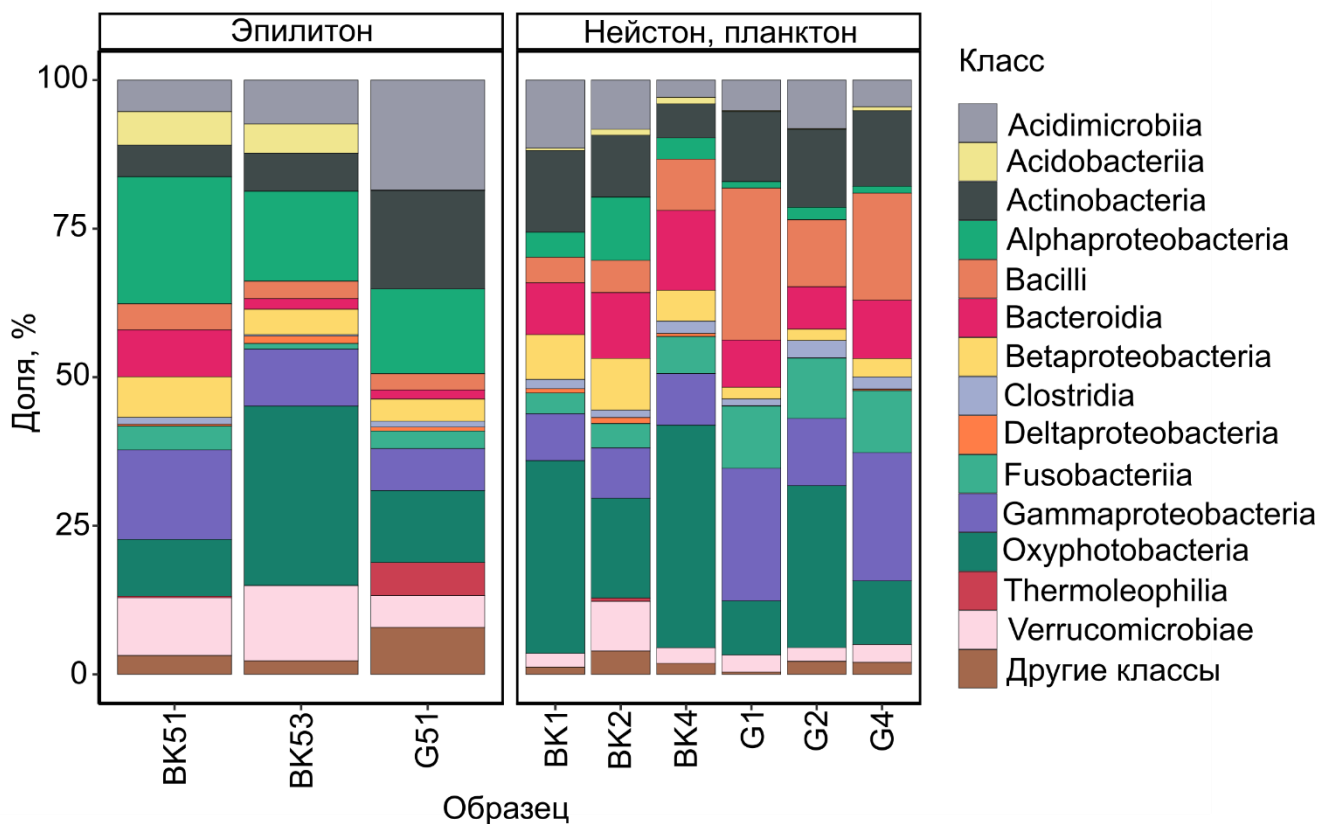


Рисунок 5 – Таксономический состав микробных сообществ эпилитона (G51, BK51, BK53), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал по данным метагеномного анализа фрагментов гена 16S рРНК

Разнообразие денитрифицирующих бактерий по генам *nirS* и *nirK*

В целом для гена *nirS* получено 73318 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. 6).

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 *Gamma*proteobacteria и представлены порядками *Steroidobacterales* (30%), *Pseudomonadales* (22%), *Xanthomonadales* (22%), *Chromatiales* (10%) и неклассифицированными гаммапротеобактериями (16%).

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%).

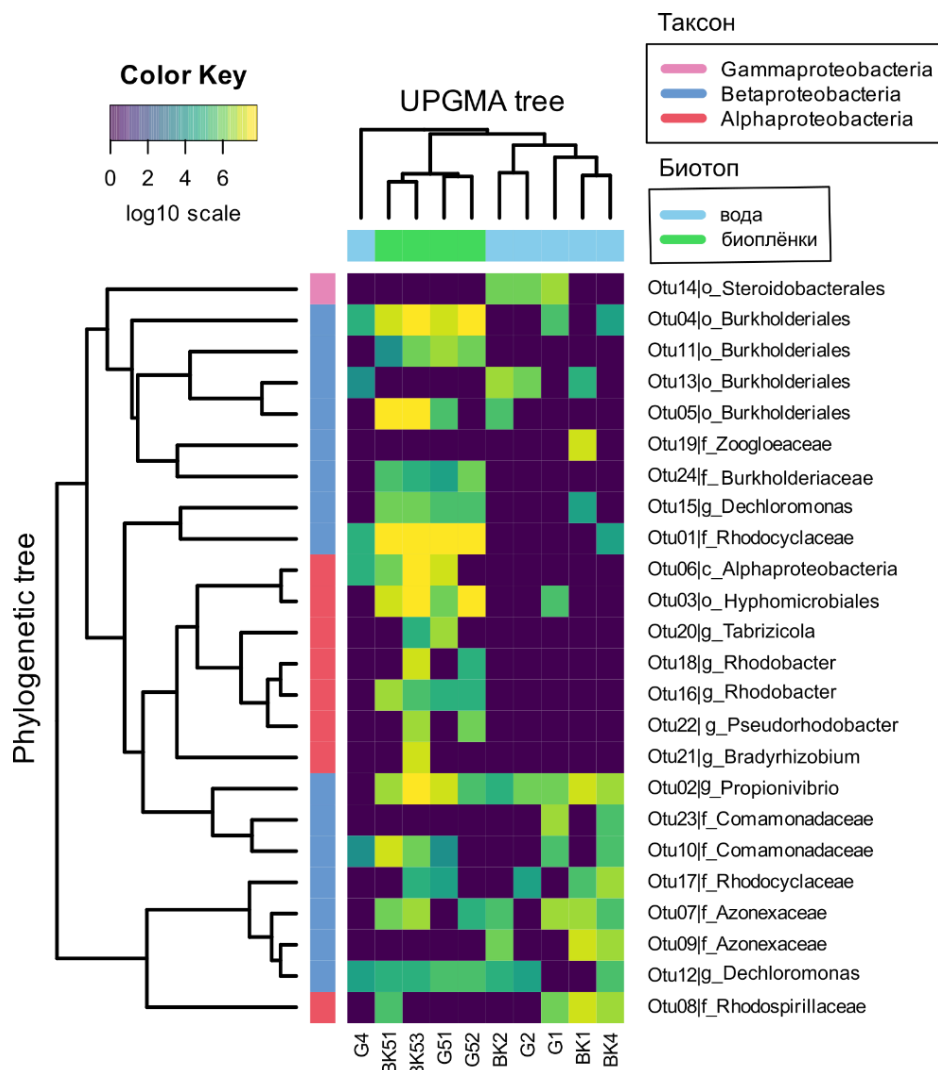


Рисунок 6 – Тепловая карта и филогенетическое дерево 24 наиболее представленных ОТЕ гена *nirS*, UPGMA дендрограмма микробных сообществ эпилитона (BK51, BK53, G51, G52), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал

Методом UPGMA показано, что *nirS*-содержащие бактерии, населяющие биопленки каменистых субстратов, достоверно отличаются по видовому составу от *nirS*-содержащих бактерий, обитающих в воде (рис. 6). Индексы Шеннона и Chaol демонстрируют, что наибольшее разнообразие и видовое богатство денитрификаторов *nirS*-типа характерно для образцов эпилитона (G51, BK53), наименьшее для образцов водной толщи (G2, BK2).

Для гена *nirK* получено 76269 последовательностей. Нуклеотидные последовательности объединены в 122 ОТЕ (95% уровень сходства). Количество доминирующих ОТЕ (>1% последовательностей) составило 21, они содержали 82% от общего количества последовательностей (рис. 7).

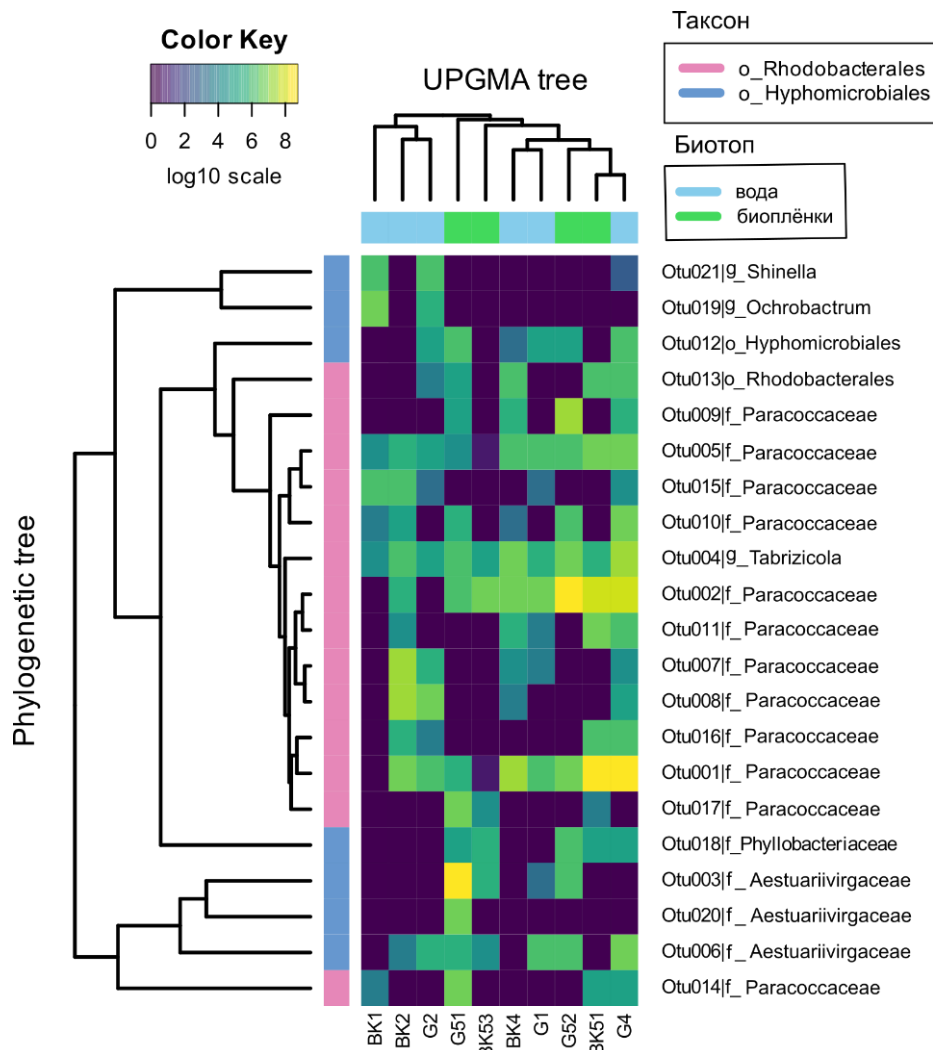


Рисунок 7 –Тепловая карта и филогенетическое дерево 21 наиболее представленной ОТЕ гена *nirK*, UPGMA дендрограмма микробных сообществ эпилитона (BK51, BK53, G51, G52), нейстона (BK1, G1) и планктона (BK2, BK4, G2, G4) оз. Байкал

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

Установлено, что большая часть последовательностей (69,5%) принадлежит бактериям рода *Tabrizicola* (*Alphaproteobacteria*, *Rhodobacterales*; 60 ОТЕ, сходство с гомологом 82-99%).

Методом UPGMA выявлено, что *nirK*-содержащие бактерии, обитающие в биопленках каменистых субстратов и воде, достоверно не отличаются по видовому составу (рис. 7). Согласно индексам Шеннона и Чоа1, 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 Чоа1 в образце поверхностного микрослоя воды (BK1).

С помощью RDA анализа продемонстрировано, что видовое богатство *nirK*-бактерий в придонном слое воды на исследуемых станциях связано с более высокой концентрацией нитратного азота (рис. 8).

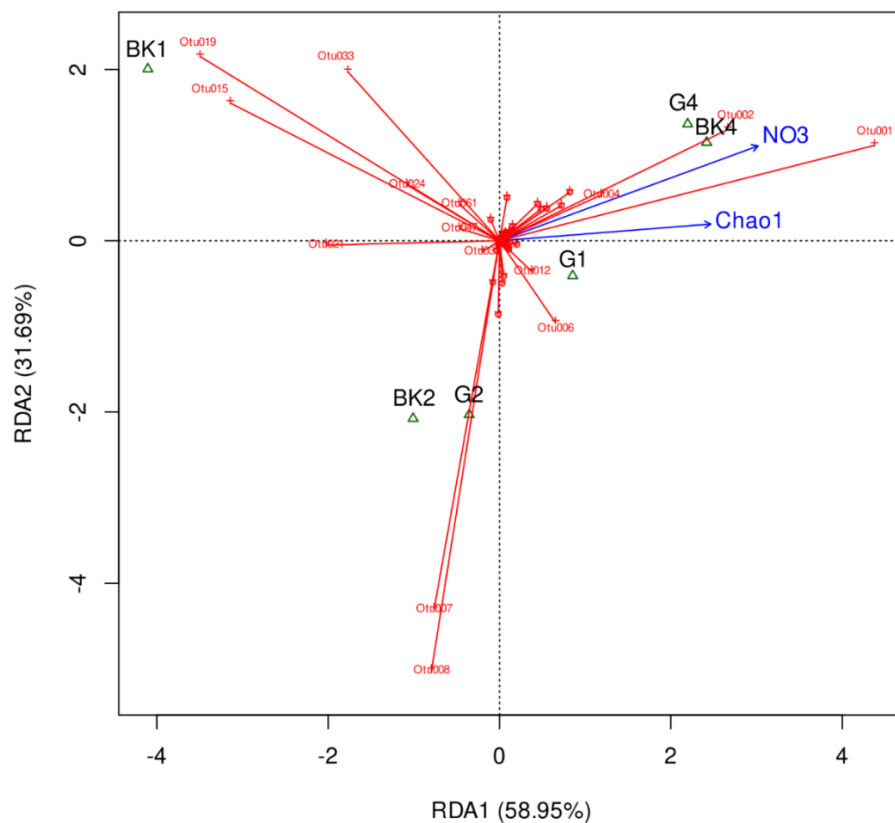


Рисунок 8 – Анализ избыточности (RDA), показывающий взаимосвязь структуры *nirK*-содержащих денитрифицирующих сообществ с факторами окружающей среды ($p < 0,05$). Образцы станций Б. Коты (BK) и Б. Голоустное (G) представлены треугольниками: BK1 и G1 – поверхностный микрослой воды, BK2 и G2 – водная толща, BK4 и G4 – придонный слой воды

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

Для оценки разнообразия аммонийнокисляющих (АОБ) и нитритокисляющих (НОБ) бактерий в микробных сообществах литоральной зоны оз. Байкал проведено

высокопроизводительное 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. Таксономический состав АОБ представлен семейством *Nitrosomonadaceae* (*Betaproteobacteria*) – 47 филотипов (ОТЕ, кластерное расстояние 0,03). Данное семейство, в свою очередь, содержало род *Nitrosospira* (3 ОТЕ), некультивированные 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 неидентифицированные бактерии (3 ОТЕ). Бактерии Ellin6067 доминировали, составляя значительную долю окислителей аммония во всех исследуемых микробных сообществах. Бактерии рода *Nitrosospira* обнаружены только в водной толще. Наибольшее разнообразие АОБ характерно для микробиомов эпилитных биопленок (28 ОТЕ), наименьшее – для поверхностной воды (13 ОТЕ).

НОБ выявлены в 38% исследуемых проб в минорном количестве, составляя менее 0,5% от общего количества последовательностей. Разнообразие НОБ представлено родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga* (*Gammaproteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospinota*. Бактерии р. *Nitrospira* (7 ОТЕ) доминировали и встречались во всех образцах. Следует отметить, что для сообществ биопленок и воды общих ОТЕ не выявлено. Возможно, некоторые из обнаруженных филотипов способны проводить полное окисление аммония до нитрата. Неидентифицированные бактерии филы *Nitrospinota* выявлены в биопленках и придонной воде на станциях зал. Лиственничный и г. Северобайкальск. 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 биопленочных обрастаниях на станции м. Елохин обнаружены последовательности, гомологичные кандидатному роду *Nitrotoga*. 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).

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСТОЧНИКА АЗОТА НА РОСТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

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

Штаммы *Pseudomonas* sp. 1СБ и *Streptomyces* sp. 21А формировали биопленку на стекле только в среде с нитратом (рис. 9), в среде без азота обнаружены единичные клетки бактерий.

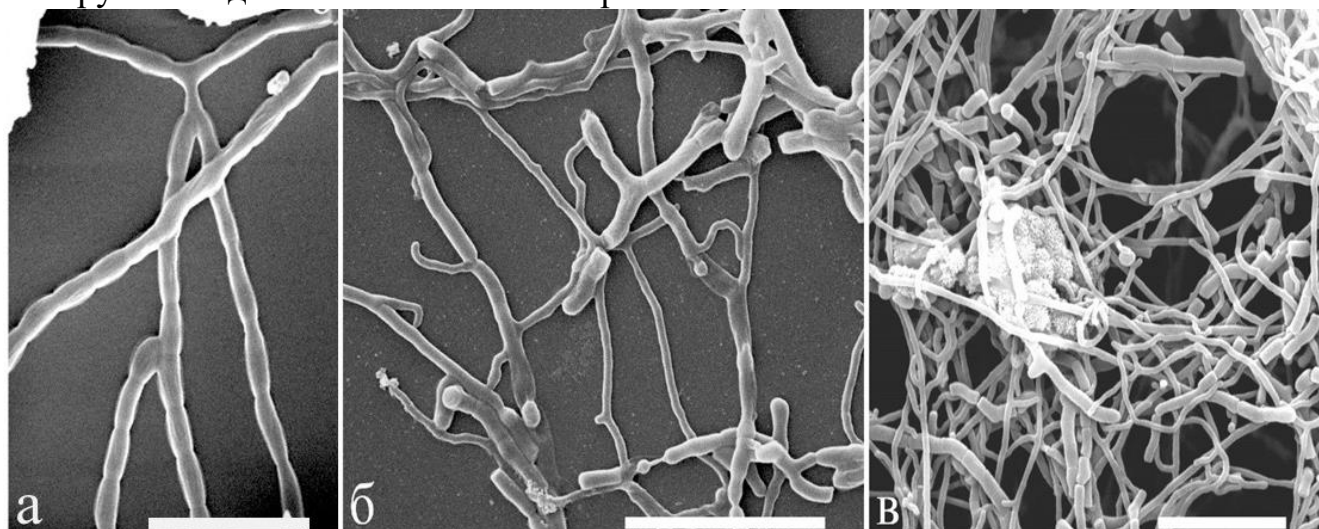


Рисунок 9 – Образование биопленки штаммом *Streptomyces* sp. 21А в среде с нитратом на 3 (а), 5 (б) и 7 (в) сутки культивирования. СЭМ, масштаб – 5 мкм

Штамм *Rhizobium* sp. 2А формировал биопленку на стекле в среде с нитратом (рис. 10 а-в) и в среде без доступного азота (рис. 10 г-е) в течение 7 суток культивирования. В безазотной среде *Rhizobium* sp. 2А способен самостоятельно превращать молекулярный азот в аммоний. При микроскопическом наблюдении в среде без 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.

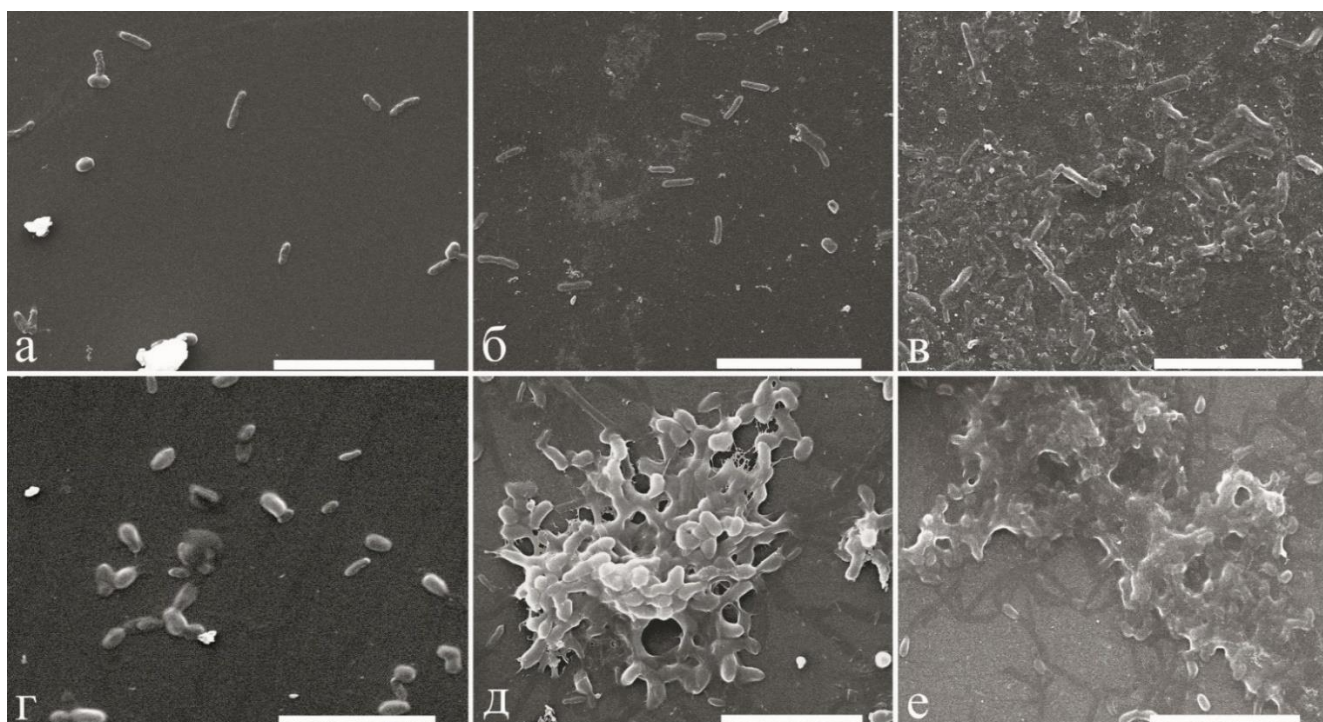


Рисунок 10 – Образование биопленки штаммом *Rhizobium* sp. 2А на 3 (а), 5 (б), 7 (в) сутки культивирования в среде с нитратом и на 3 (г), 5 (д), 7 (е) сутки культивирования в среде без доступного источника азота. СЭМ, масштаб: а-д – 10 мкм, е – 20 мкм

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 эпилите 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 эпилите варьировала в зависимости от расположения станций.

2. Пространственное распределение численности культивируемых аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в планктоне и эпилите 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 эпилите, *nirK*-содержащих – в придонной воде. Среди некультивируемых денитрификаторов доминировали бактерии родов *Dechloromonas* (*Betaproteobacteria*) и *Tabrizicola* (*Alphaproteobacteria*). Культивируемые денитрификаторы в эпилите представлены видами *Pseudomonas gessardii* и *Pseudomonas veronii* (*Gammaproteobacteria*).

4. Аммонийоксиляющие бактерии в эпилите и планктоне литорали оз. Байкал представлены семейством *Nitrosomonadaceae*, нитритоксиляющие бактерии – родами *Nitrospira* (*Nitrospirota*), *Candidatus Nitrotoga* (*Gammaproteobacteria*) и неидентифицированными бактериями филы *Nitrospinota*. Наибольшее разнообразие нитрифицирующих бактерий характерно для эпилита, 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 эпилита. В планктоне количество аммонификаторов значимо связано с концентрацией ионов аммония, численность денитрификаторов зависит от концентрации нитратов и нитритов. 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Подлесная Г.В.**, Потапов С.А., Краснопеев А.Ю., Штыкова Ю.Р., Томберг И.В., Тимошкин О.А., Белых О.И. Разнообразие денитрифицирующих бактерий в биопленках, сформированных на каменистых субстратах в литоральной зоне озера Байкал // Микробиология. – 2020. – Т. 89, № 3. – С. 367–371.

2. **Podlesnaya G.V.**, Krasnopeev A.Yu., Potapov S.A., Tikhonova I.V., Shtykova Yu.R., Suslova M.Yu., Timoshkin O.A., Belykh O.I. Diversity of nitrifying bacteria in microbial communities from water and epilithic biofilms of the Lake Baikal littoral zone // Limnology and Freshwater Biology. – 2020. – № 4. – С. 1008–1010.

3. Galachyants A.D., Krasnopeev A.Y., **Podlesnaya G.V.**, Potapov S.A., Sukhanova E.V., Tikhonova I.V., Zimens E.A., Kabilov M.R., Zhuchenko N.A., Gorshkova A.S., Suslova M.Y., Belykh O.I. Diversity of Aerobic Anoxygenic Phototrophs and Rhodopsin-Containing Bacteria in the Surface Microlayer, Water Column and Epilithic Biofilms of Lake Baikal // Microorganisms. – 2021. – V. 9, № 4. – P. 842.

4. **Подлесная Г.В.**, Сулова М.Ю., Штыкова Ю.Р., Томберг И.В., Елецкая Е.В., Тимошкин О.А., Белых О.И. Сезонные и пространственные вариации численности аммонифицирующих и денитрифицирующих бактерий в сообществах планктона и эпилимниона литорали оз. Байкал // Сибирский экологический журнал. – 2021. – Т. 28, № 5. – С. 641–652.

5. Горшкова А.С., **Подлесная Г.В.**, Жученко Н.А., Тихонова И.В., Сулова М.Ю., Небесных Ю.Р., Зименс Е.А., Белых О.И. Экологические факторы и денитрифицирующие бактерии эпилимниона озера Байкал // Сибирский экологический журнал. – 2024. – № 1. – С. 18–29.

В материалах конференций:

1. **Podlesnaya G.V.**, Suslova M.Yu., Belykh O.I. Detection of strains involved in nitrogen cycle in the cultivated microbial community of Lake Baikal biofilms // Book of abstracts «13th International Conference on Salt Lake Research», August 21-25, 2017, Ulan-Ude, P. 17.

2. **Подлесная Г.В.**, Сулова М.Ю., Штыкова Ю.Р., Зименс Е.А., Суханова Е.В., Томберг И.В., Белых О.И. Бактерии круговорота азота в литоральной зоне озера Байкал // Тезисы докладов Международной научно-практической конференции «Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий», 23 апреля 2018 г., Иркутск, С. 85–87.

3. **Подлесная Г.В.**, Галачьянц А.Д., Белых О.И. Денитрифицирующие бактерии культивируемого микробного сообщества поверхностного микрослоя озера Байкал // Тезисы докладов и стендовых сообщений Международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы» 10-14 сентября, 2018 г., Иркутск, С. 274–275.

4. **Подлесная Г.В.**, Сулова М.Ю., Штыкова Ю.Р., Белых О.И. Характеристика денитрифицирующих бактерий из биопленок литоральной зоны озера Байкал // Тезисы докладов и стендовых сообщений Международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы» 10-14 сентября, 2018 г., Иркутск, С. 275–276.

5. **Подлесная Г.В.**, Краснопеев А.Ю., Зименс Е.А., Потапов С.А., Тихонова И.В., Сулова М.Ю., Белых О.И. Разнообразие денитрифицирующих бактерий в литорали озера Байкал // Тезисы Всероссийской конференции с международным участием «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» 3-7 июля, 2023 г., Улан-Удэ – Байкальск, С. 88.