

## Потребление аминокислот некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища

О. В. КОЛМАКОВА, М. Ю. ТРУСОВА\*

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

\*Институт биофизики СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок  
E-mail: mtrusova@ibp.krasn.ru

### АННОТАЦИЯ

В экспериментальных микроэкосистемах выявлены с использованием нестерильного культивирования виды (клоны) бактериопланктона водохранилища, питающиеся лизином и глицином. Структуру сообщества анализировали, применяя метод разделения амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК бактерий в условиях денатурирующего градиентного гель-электрофореза. Идентификация доминирующих видов (клонов) бактериопланктона проведена с использованием молекулярного клонирования и определения нуклеотидной последовательности участка гена 16S рибосомальной РНК. Обнаружено, что глицин – одна из преобладающих аминокислот эвтрофного водоема, и лизин, чье содержание в природной воде более низкое, служили питательными субстратами для разных субдоминантных видов (клонов) бактериопланктона. Таким образом, установлено, что виды свободноживущего бактериопланктона являются узкоспециализированными по потреблению отдельных аминокислот.

**Ключевые слова:** свободноживущий некультивируемый бактериопланктон, аминокислоты, ПЦР-ДГГЭ, микроэкосистемы, 16S рибосомальная РНК.

Важнейшим трофическим звеном любой экосистемы, как известно, являются редуценты. В пелагических экосистемах звено редуцентов представлено бактериопланктоном. Во многих моделях качества природных вод бактериопланктон описывается как агрегированная компонента [1, 2]. Причиной агрегирования заведомо разных видов бактерий в одно звено является трудность идентификации видового состава бактериопланктона. Основным методом определения видовой принадлежности бактерий в течение длительного периода было культивирование на твердых

селективных средах. Однако, поскольку на твердых средах вырастает не более 1–3 % свободноживущих планктонных бактерий, определяемых прямым счетом [3–5], до недавнего времени видовой состав 97 % видов бактерий оставался неизвестным.

Отсутствие видовой идентификации делало невозможным определение функциональной роли большинства видов некультивируемого бактериопланктона в экосистеме. Как правило, выделялись целые группы бактерий, предположительно объединенные общей биогеохимической функцией. Подробно изучалось участие агрегированных групп водных микроорганизмов в процессах фото- и хемосинтеза и деструкции органических веществ

Колмакова Олеся Владимировна  
Трусова Мария Юрьевна

(углеводов, белков, аминокислот, аминоксахаров, альгиновых кислот, углеводов, гуминовых веществ и др.) в круговороте азота и других элементов [3, 6–10]. Однако роль отдельных видов в деструкции органических веществ, в частности аминокислот, до сих пор остается неизвестной в связи с трудностями видовой идентификации бактериопланктона. При этом многие авторы указывают на необходимость определения филогенетической принадлежности бактериопланктона, участвующего в тех или иных биогеохимических процессах [7, 9]. Такую возможность потенциально предоставляет применение молекулярно-генетического метода определения видовой принадлежности бактерий, появившегося в последние два десятилетия. Цель нашей работы – молекулярно-генетическая идентификация бактериопланктона, потребляющего аминокислоты.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

**Описание эксперимента.** Природную воду для экспериментов отбирали в эвтрофном водохранилище Бугач. Подробное описание экосистемы водохранилища, включая состав растворенных в воде аминокислот, приведено в работах [11, 12].

Эксперимент проводили с 30 июня по 6 июля в лабораторных микроэкосистемах (МЭС) объемом 10 л. Подробное описание МЭС приведено в работах [13, 14]. Ранее установлено, что в МЭС в течение 7–10 сут сохраняется и функционирует естественное планктонное сообщество, включающее фито-, зоо- и бактериопланктон [15]. Нестерильное культивирование в МЭС – единственный экспериментальный способ работы с некультивируемыми видами бактериопланктона, многие из которых не способны существовать вне сообщества [5]. Пробы воды из водохранилища, содержащие естественный планктон, инокулировали в три МЭС. В МЭС № 1 добавили аминокислоту L-лизин (лизина монохлоргидрат, Реахим) в концентрации  $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ , в МЭС № 3 – L-глицин (Reanal) в той же концентрации. Поскольку в водохранилище Бугач наблюдаемые концентрации данных аминокислот составляли менее  $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  [11], для обеспечения отклика бактериального со-

общества на добавляемый субстрат использованы 100-кратные концентрации глицина и лизина. МЭС № 2 была контрольной. Температуру воды в МЭС поддерживали на уровне летней в водоеме –  $22 \text{ }^\circ\text{C}$ . Освещенность МЭС была  $7,0 \text{ Вт/м}^2$ , фотопериод – 16 ч свет, 8 ч темнота. Перемешивание воды в МЭС производилось дважды в сутки стеклянным шпателем.

Пробы воды для определения видового состава бактериопланктона в объеме 100 мл отобрали первоначально из общей пробы воды водохранилища перед заполнением МЭС, а затем – отдельно из каждой МЭС на 2, 3, 4, 5 и 6-е сут эксперимента.

**Выделение геномной ДНК.** После предварительной фильтрации через крупнопористые мембранные фильтры  $2,5 \text{ мкм}$  бактериопланктон концентрировали из объема 100 мл фильтрованием на стерильных бактериальных фильтрах  $0,22 \text{ мкм}$ . Геномную ДНК из бактериопланктона, сконцентрированного на мембранах, выделяли по методу Бострома с соавторами [16]. Для этого мембраны разрезали на части, помещали в стерильные 2 мл пластиковые пробирки и добавляли 525 мкл лизирующего буфера ( $400 \text{ mM NaCl}$ ,  $750 \text{ mM}$  сахараза,  $20 \text{ mM}$  ЭДТА,  $50 \text{ mM}$  трис- $\text{HCl}$  pH 9,0) и 11 мкл раствора лизоцима (конечная концентрация  $1 \text{ мг/мл}$ ), инкубировали 30 мин при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Затем в пробирки добавляли 60 мкл раствора додецилсульфата натрия (SDS, конечная концентрация  $1 \%$ ) и 3 мкл раствора протеиназы К (конечная концентрация  $100 \text{ мкг/мл}$ ) и инкубировали при  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  12 ч. Продукты лизиса переносили в чистые пробирки, фильтры дополнительно промывали 500 мкл ТЕ буфера ( $10 \text{ mM}$  трис- $\text{HCl}$  pH 8,0,  $2 \text{ mM}$  ЭДТА), который затем объединяли с лизатами. К ДНК-содержащим растворам добавляли 1/10 объема  $3 \text{ M}$  раствора ацетата натрия, перемешивали и осаждали ДНК  $2,5$  объемами 96%-го этанола при  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Пробирки центрифугировали 20 мин при  $20000 \text{ g}$  и  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Осадки промывали 70%-м этанолом. После удаления этанола осадки подсушивали на воздухе и растворяли в 100 мкл буфера ТЕ.

Качество и количество выделенной высокомолекулярной ДНК анализировали методом электрофореза в 1%-м агарозном геле.

**Денатурирующий градиентный гель-электрофорез.** Фрагменты гена 16S рРНК длиной 586 п. н. амплифицировали из суммарной геномной ДНК бактериопланктона с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с универсальными праймерами GC-341F (5'-ССТ АСG GGA GGC AGC AG-3', на 5'-конце присоединен "GC-clamp" 5'CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C-3') и 926R (5'Ў-ССG TCA ATT CA/СТ TTG AGT TT-3') [17]. Реакционная смесь для ПЦР оптимизирована под данную пару праймеров и содержала 67 мМ трис-НС1, рН 8,8 при 25 °С, 0,01 % Tween 20, 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 % диметилсульфоксида (ДМСО), 0,2 мМ каждого dNTP, по 10 пмоль каждого праймера, 2,5 ед. акт. Taq ДНК полимеразы, 10 нг ДНК. ПЦР проводили на приборе Biometra TPersonal (Biometra, Германия) в следующем температурно-временном режиме: первый цикл – 94 °С, 30 с; 65 °С, 35 с; 72 °С, 40 с; затем понижение температуры отжига на 1 °С/цикл в течение 10 циклов; 20 циклов – 94 °С, 30 с; 56 °С, 35 с; 72 °С, 40 с и окончательная полимеризация при 72 °С, 5 мин. Для контроля контаминации ставили отрицательную контрольную реакцию, в которую вместо ДНК-матрицы добавляли стерильную воду. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1,2 % агарозном геле. ПЦР-продукты концентрировали спиртовым переосаждением и использовали 800 нг полученной ДНК для анализа методом ДГГЭ.

ДГГЭ выполняли на приборе DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, США) в 6%-м полиакриламидном геле с градиентом денатурирующего фактора от 40 до 70 % (100%-й денатурирующий фактор представляет собой смесь 7М раствора мочевины и 40%-го деионизованного формамида). Электрофорез вели при 60 °С в однократном ТАЕ буфере при напряжении 100 В в течение 17 ч. По окончании электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и получали цифровые изображения в УФ (302 нм) свете на приборе AlphaImager (Alpha Innotech Corp., США). Полосы ДНК, соответствующие субдоминантным видам бактерий, потребляющих глицин и лизин, вырезали из геля стерильным скальпелем и хранили в стерильных микропробирках при –20 °С.

**Клонирование.** Для клонирования ПЦР-продуктов готовили Т-вектор [18]. Для этого плазмиду pBluescript II (Stratagene, США) обрабатывали рестриктазой EcoR V (СибЭнзим, Новосибирск), достраивали "липкие" 3'-Т-концы двухчасовым инкубированием при 72 °С с Taq ДНК полимеразой и dTTP. Полученный Т-вектор очищали препаративным электрофорезом в 0,8%-м агарозном геле и выделяли из геля с помощью набора MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия).

Фрагменты гена 16S рРНК бактерий и Т-вектор лигировали высокоактивной Т4 ДНК лигазой (СибЭнзим, Новосибирск) при 16 °С. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, США). Компетентные клетки *E. coli* готовили стандартным методом, используя TFB буфер, как описано у Сэмбрука и др. [19]. Клеточную суспензию высевали на 1,5%-й LB-агар, содержащий 100 мкг/мл ампициллина, 80 мкг/мл X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид) и 80 мкг/мл ИПТГ (изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид). Отбор клонов, содержащих вставку, проводили методом "бело-голубого" скрининга [19]. Белые колонии переносили в микропробирки, содержащие 20 мкл 10 мМ трис-НС1, рН 8,0. Для анализа размера вставок проводили ПЦР с 2 мкл суспензии клеток в качестве матрицы, используя праймеры, комплементарные участкам плазмиды в районе вставки (M13-Up 5'-ССТ TTG TCG ATA CTG GTA-3', M13-Down 5'-GTT GTA AAA CGA CGG CCA GTG A-3'). Условия реакции: первый цикл – 94 °С, 2 мин; 60 °С, 1 мин; 72 °С, 1 мин; 29 циклов – 94 °С, 30 с; 60 °С, 40 с; 72 °С, 40 с и окончательная полимеризация 72 °С, 5 мин. Полученные продукты реакции анализировали электрофорезом в 1,2%-м агарозном геле. После окрашивания геля бромистым этидием полосы искомого размера (1124 п. н.) вырезали из геля под длинноволновым УФ и выделяли ДНК как описано выше.

**Определение нуклеотидной последовательности.** Нуклеотидную последовательность полученных вставок определяли на автоматическом секвенаторе ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech, США) Центра коллективного пользования приборами НОЦ "Енисей" (СФУ, Красноярск) с помощью набора

Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit (Amersham Pharmacia Biotech, США) согласно рекомендациям производителя. Для секвенирования применяли универсальные плазмидные праймеры M13. Полученные нуклеотидные последовательности генов 16S рРНК депонированы в базе данных GenBank под номерами HM072086 и HM072087, а также в базе EMBL под номерами FN773496-FN773499.

**Филогенетический анализ.** Полученные нуклеотидные последовательности гена 16S рРНК сравнивали с последовательностями баз данных GenBank и EMBL с помощью онлайн-сервиса BLAST [URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>]. Далее было построено филогенетическое древо с помощью программного обеспечения Mega [URL: <http://www.megasoftware.net/>]. Использовался метод присоединения ближайших соседей с 1000 повторов бутстреп-анализа. В качестве внешнего (корневого) вида выбрана архея *Halo-bacterium* sp.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании анализа ДГГЭ-геля (рис. 1) в исходной пробе (см. рис. 1, Исх) выявлено 25 клонов (видов) бактерий. В контрольной МЭС № 2 (см. рис. 1, К-2 – К-6) в течение всего эксперимента не происходило существенных качественных и количественных изменений состава бактериопланктона по сравнению с исходной пробой (см. рис. 1, Исх).

Данный результат означает, что в контрольной МЭС № 2 в течение всего эксперимента функционировало естественное сообщество бактериопланктона водохранилища.

В МЭС № 3 с добавкой глицина состав бактериопланктона уже на вторые сутки эксперимента (см. рис. 1, Г-2) резко отличался от исходной пробы (см. рис. 1, Исх). Клон Gly1, присутствовавший в исходной пробе (см. рис. 1, Исх), вышел в доминанты уже на вторые сутки (см. рис. 1, Г-2) и продолжал доминировать до четвертых суток эксперимента (см. рис. 1, Г-2 – Г-4). На третьи сутки в МЭС № 3 появился субдоминант Gly2 (см. рис. 1, Г-3). На четвертые сутки эксперимента профиль существенно не менялся, начала увеличиваться доля вида Gly3 (см. рис. 1, Г-4). На пятые сутки вид Gly1 исчез из бактериального сообщества МЭС № 3, однако появился новый доминирующий клон Gly4 (см. рис. 1, Г-5). В последний день его вытеснил другой новый клон Gly5 (см. рис. 1, Г-6). В течение третьих – пятых суток в сообществе МЭС № 3 происходила также положительная динамика еще двух видов, однако в доминанты к концу эксперимента они не вышли. Таким образом, в бактериальном сообществе при добавлении глицина произошли рост численности двух исходно заметных видов с последующим исчезновением одного из них к концу эксперимента и проявление трех не обнаруживаемых в исходной пробе видов бактерий (см. рис. 1, Исх).

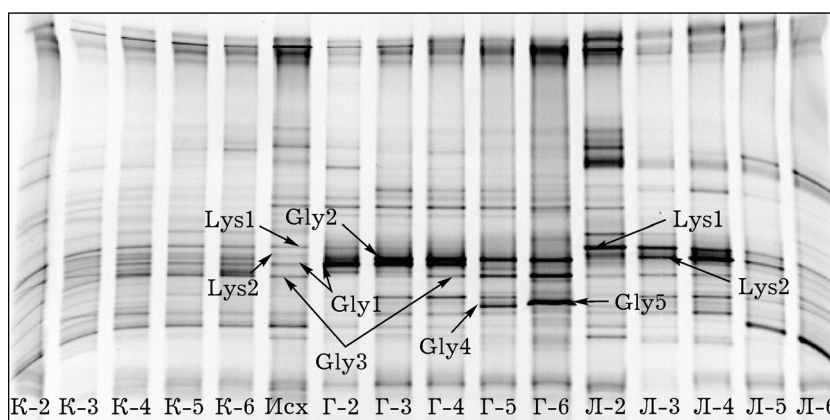


Рис. 1. ПЦР-ДГГЭ образцов бактериопланктона из МЭС № 1 (лизин, дорожки Л-2 – Л-6), МЭС № 2 (контроль, дорожки К-2 – К-6), МЭС № 3 (глицин, дорожки Г-2 – Г-6) и исходной пробы (Исх). Стрелки указывают на полосы ДНК, нуклеотидная последовательность которых определена. Цифры рядом со стрелками обозначают номер клона в таблице

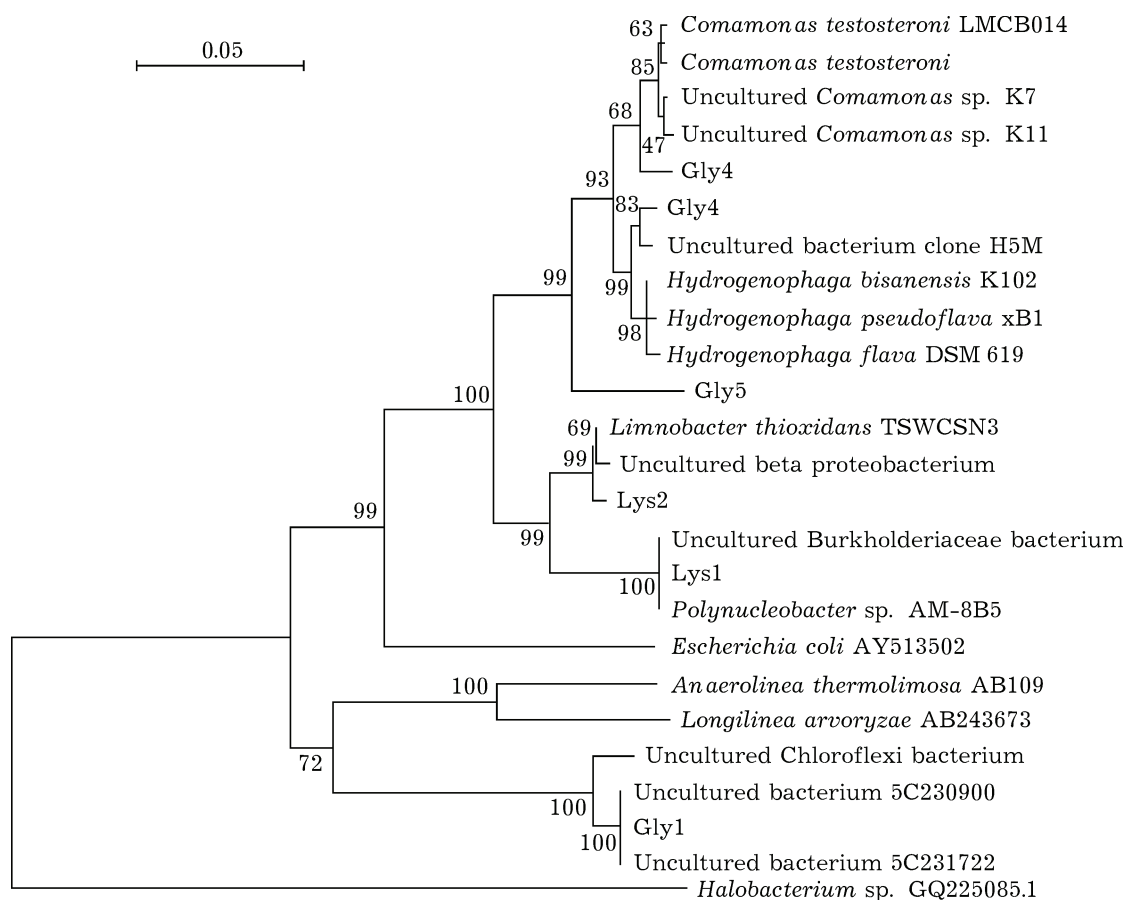


Рис. 2. Филогенетическое древо последовательностей гена 16S рРНК субдоминантных клонов, выделенных из полос ДГГЭ

В МЭС № 1 с добавкой лизина на вторые сутки эксперимента одно из доминирующих положений занял вид *Lys1* (см. рис. 1, Л-2), однако к концу эксперимента его доля уменьшилась (см. рис. 1, Л-3 – Л-6). К четвертым суткам в доминанты вышел вид *Lys2* (см. рис. 1, Л-3 – Л-4), но впоследствии он также уступил место двум новым видам (см. рис. 1, Л-5 – Л-6).

По результатам филогенетического анализа (рис. 2) клоны *Lys1* и *Lys2*, доминировавшие в течение первых трех суток в МЭС № 1 с добавкой лизина (см. рис. 1, Л-1 – Л-3), принадлежали к семейству Burkholderiaceae класса Бетапротеобактерий. Ближайшие родственники клонов *Gly2*, *Gly4* и *Gly5* из МЭС № 3 с добавкой глицина (см. рис. 1, Г-2 – Г-6) принадлежали к семейству Comamonadaceae того же класса. Клон *Gly5* (см. рис. 1, Г-6) образовал отдельную ветвь, далеко отстоящую от всех остальных представителей се-

мейства Comamonadaceae (см. рис. 2). Клон *Gly1* (см. рис. 1, Г-2) оказался наиболее близок некультивируемым клонам класса Chloroflexi (см. рис. 2). Некультивируемые клоны этого класса, включая *Gly1*, образуют отдельный кластер, далеко отстоящий от всех известных культивируемых видов этого класса (см. рис. 2). Определить нуклеотидную последовательность исследуемого участка гена 16S рРНК клона *Gly3* (см. рис. 1, Исх – Г6) на данный момент не удалось.

Итак, отдельные виды (клоны) некультивируемого свободноживущего бактериопланктона оказались узкоспециализированными по способности к потреблению отдельных аминокислот. На добавление отдельной аминокислоты реагировало не все бактериальное сообщество, а лишь небольшое число клонов, имевших в исходных пробах сравнительно низкую численность. Полученные результаты полностью согласуются с ранее прове-

денными экспериментами [20], однако молекулярно-генетическая идентификация узкоспециализированных клонов проведена впервые.

Ранее нами выдвинуто предположение, что в отличие от традиционных представлений, согласно которым группы водных бактерий подразделяются на потребителей всего класса тех или иных веществ (например, липидов, сахаров, аминокислот), массовые виды бактериопланктона могут оказаться узкоспециализированными, т. е. потребляющими преимущественно одно простое вещество [20]. Хорошо известно, что одни и те же клоны (виды) бактериопланктона обнаруживаются в абсолютно разных экосистемах, кардинально отличающихся по составу продуцентов и консументов [21–23]. Не исключено, что подобный космополитизм (эвритопность) свидетельствует о потреблении бактериопланктоном простых веществ, универсальных для всех водных экосистем, например аминокислот. Если бы те или иные клоны свободноживущих планктонных бактерий потребляли сложные органические метаболиты и продукты разложения других организмов, их присутствие зависело бы от видового состава других групп планктона, как это происходит в случае прикрепленного бактериопланктона [4]. Питание простыми субстратами требует узкой специализации гетеротрофов, иначе невозможным становится достижение такого важного фактора устойчивости сообществ, как биоразнообразие.

В связи с упомянутым выше космополитизмом (эвритопностью) возникает вопрос, действительно ли все идентифицированные клоны изначально присутствовали в природной воде водохранилища, а не были занесены случайно из воздуха или с оборудования при заведомо нестерильном культивировании? Прежде всего, отметим, что клоны Gly1, Gly3, Lys1 и Lys2 присутствовали как в исходной пробе из водохранилища, так и в контроле, но в значительно меньшем количестве, чем в экспериментальных МЭС с соответствующими добавками (см. рис. 1). Вероятно, Gly2, Gly4 и Gly5 также содержались в исходной пробе из водохранилища, но не проявлялись при ДГГЭ-анализе. Следует отметить, что метод ДГГЭ позволяет обнару-

жить виды, численность которых в сообществе составляет более 1–2 %, поэтому появление новых полос ДНК на “профиле сообщества” свидетельствует, как правило, не о появлении нового вида в экосистеме, а об увеличении его численности до определяемой величины [24]. Важно подчеркнуть, что в контрольной МЭС № 2 (см. рис. 1, К-2 – К-6) в течение всего эксперимента не происходило существенных качественных и количественных изменений состава бактериопланктона по сравнению с исходной пробой (см. рис. 1, Исх). Данный результат хорошо согласуется с полученными ранее доказательствами устойчивого функционирования естественных планктонных сообществ в аналогичных МЭС [15]. Таким образом, все клоны Gly и Lys проявлялись и увеличивали численность в МЭС с добавками аминокислот не в результате артефактов, связанных с нестерильным культивированием, а вследствие добавок определенных аминокислот. Добавляемые аминокислоты также являются обычными компонентами воды водохранилища Бугач. В предыдущие годы глицин отмечен среди аминокислот с наиболее высокой концентрацией, его содержание составляло в среднем 7,72 % от их общей суммы. Содержание лизина было несколько ниже (4,46 %), но эта аминокислота также присутствовала в пробах в течение всего вегетационного сезона [11].

Хотя мы связываем проявление и доминирование клонов Gly именно с добавкой глицина, не исключено, что непосредственно потребляют эту аминокислоту лишь клоны Gly1 и Gly2. Численность этих клонов резко увеличилась непосредственно после добавки глицина, а на пятые сутки резко снизилась (см. рис. 1). Маловероятно, что на снижение численности клона Gly1 оказало влияние “выедание” глицина, поскольку его концентрация в 100 раз превышала максимальную, характерную для водохранилища. Возможно, в снижении численности этих клонов сыграл роль неизвестный нам лимитирующий фактор. После снижения численности Gly1 доминирующее положение в ДГГЭ-профиле бактериального сообщества заняли неидентифицированные клоны Gly3, Gly4 и позднее Gly5 (см. рис. 1). Не исключено, что клоны

**Субдоминантные клоны, выделенные из наиболее ярких полос ДГГЭ бактериального сообщества  
микроэкосистем в ходе эксперимента с добавлением аминокислот**

Клон	Номер депонирования	Длина, п. н.	Ближайший родственник	Сходство, %	Группа
Lys-1	HM072087	584	Uncultured Burkholderiaceae bacterium clone Gap-2-60 (EU642211)	100	Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae
Lys-2	HM072086	585	<i>Limnobacter thiooxidans</i> strain TSWCSN35 (GQ284439)	99	Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae
Gly-1	FN773496	562	Uncultured bacterium clone 5C231722 (EU804038)	100	Chloroflexi ?
Gly-2	FN773497	585	Uncultured bacterium clone H5M13F (EU796063)	99	Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Gly-4	FN773498	585	Uncultured <i>Comamonas</i> sp. clone K11 (FN434426)	98	Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae
Gly-5	FN773499	585	Uncultured <i>Comamonas</i> sp. clone K7 (FN434424)	96	Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae

Gly4 и Gly5 потребляют не саму аминокислоту, а органические вещества мертвых клеток клонов Gly1 и Gly2.

Филогенетический анализ исследованных клонов выявил следующее. Gly1 имел 100%-ю идентичность анализируемого участка гена 16S рРНК с некультивируемым бактериальным клоном, наиболее близким к отделу Chloroflexi (см. рис. 2, таблицу). Данный клон обнаружен в воде озер Китая, Греции, Северной, Центральной и Южной Америки (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Gly2 оказался на 99 % сходен с некультивируемым клоном из семейства Comamonadaceae класса β-протеобактерий, обнаруженным в сточных водах. Gly4 имел 98%-е сходство со штаммами *Comamonas testosteroni*, выделенными из сточных вод фабрики, производящей тетрациклин. Последовательность нуклеотидов проанализированного участка гена 16S rRNA клона Gly5 имела лишь 96%-е сходство с ближайшими родственниками семейства Comamonadaceae. Таким образом, согласно общепринятому “правилу 97 %” [25], Gly5 является новым, ранее не описанным видом.

Последовательность нуклеотидов исследованного участка 16S рРНК клона Lys1 оказалась на 100 % идентична некультивируемому бактериальному клоноу семейства Burkholderiaceae (*Polynucleobacter* sp.). Этот клон обнаружен в водах высокогорного озера, в оз. Мичиган и в Чесапикском заливе (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Lys2 на 99 % был идентичен штамму *Limnobacter thiooxidans*, обнаруживаемому в осадочных образцах пресноводного родника. Аналогичные некультивируемые клоны обнаружены в пробе аэрозоля с береговой антарктической станции Дюмонт д’Урвилль, на поверхности снежных глыб в Андах на высоте 6350 м, во фьорде Арктического океана, над местом выхода метана вдоль края Североамериканского континента (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Идентификация видов бактериопланктона важна не только для филогении, но и для экологии. По образному выражению В. И. Вернадского [26], каждый биологический вид в природе выполняет уникальную, только ему присущую “геохимическую работу”, т. е. потребляет определенные виды

вещества и энергии и синтезирует из них другие специфические вещества, включая собственную биомассу. Знания о конкретных видах и потребляемых ими субстратах в настоящее время могут быть формализованы в математических моделях водных экосистем, предназначенных для прогноза и управления качеством природных вод [2, 27]. Точность прогноза и успешность управления, несомненно, повысятся в случае замены в моделях агрегированного бактериопланктона и агрегированного “органического вещества” на конкретные виды бактерий и конкретные виды утилизируемых ими веществ [28].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 09-04-01748.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Адамович В. В. Экспериментальное определение параметров функционирования микрофлоры Красноярского водохранилища // *Водные ресурсы*. 1992. № 2. С. 106–114.
- Гладышев М. И. Основы экологической биофизики водных систем. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1999. 113 с.
- Горленко В. М., Дубинина Г. А., Кузнецов С. И. Экология водных микроорганизмов. М.: Наука, 1977. 288 с.
- Cole J. J. Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems // *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1982. Vol. 13. P. 291–314.
- Amann R., Ludwig W., Schleifer K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation // *Microbiol. Rev.* 1995. Vol. 59, N 1. P. 143–169.
- Weiss M., Simon M. Consumption of labile dissolved organic matter by limnetic bacterioplankton: the relative significance of amino acids and carbohydrates // *Aquatic Microbial Ecology*. 1999. Vol. 17. P. 1–12.
- Grover J. P., Chrzanowski T. H. Seasonal patterns of substrate utilization by bacterioplankton: case studies in four temperate lakes of different latitudes // *Ibid.* 2000. Vol. 23. P. 41–54.
- Rosenstock B., Simon M. Sources and sinks of dissolved free amino acids and protein in a large and deep mesotrophic lake // *Limnol. Oceanogr.* 2001. Vol. 46(3). P. 644–654.
- Pérez M. T., Pausz C., Herndl G. J. Major shift in bacterioplankton utilization of enantiomeric amino acids between surface waters and the ocean's interior // *Ibid.* 2003. Vol. 48(2). P. 755–763.
- Zubkov M. V., Tarran G. A., Mary I., Fuchs B. M. Differential microbial uptake of dissolved amino acids and amino sugars in surface waters of the Atlantic Ocean // *J. of Plankton Research*. 2008. Vol. 30, N 2. P. 211–220.
- Kalachova G. S., Kolmakova A. A., Gladyshev M. I., Kravchuk E. S., Ivanova E. A. Seasonal dynamics of amino acids in two small Siberian reservoirs dominated by prokaryotic and eukaryotic phytoplankton // *Aquat. Ecol.* 2004. Vol. 38. P. 3–15.
- Gladyshev M. I., Sushchik N. N., Kolmakova, A. A., Kalachova G. S., Kravchuk E. S., Ivanova E. A., Makhutova O. N. Seasonal correlations of elemental and  $\omega$ 3 PUFA composition of seston and dominant phytoplankton species in a eutrophic Siberian Reservoir // *Ibid.* 2007. Vol. 41. P. 9–23.
- Gladyshev M. I., Sushchik N., Kalachova G. S., Shchur L. A. The effect of algal blooms on the disappearance of phenol in a small forest pond // *Water Research*. 1998. Vol. 32, N 9. P. 2769–2775.
- Суцник Н. Н., Гладышев М. И., Калачева Г. С., Плаксина И. В. Динамика биомассы микроводорослей и состава внеклеточных свободных жирных кислот в экспериментальных микроэкосистемах // *Изв. РАН. Сер. биол. наук*. 1998. № 6. С. 738–744.
- Гладышев М. И. Экспериментальные экосистемы и их применение для изучения биодеградации легкоокисляемых токсикантов в пелагиали (обзор) // *Гидробиол. журн.* 1992. Т. 28, № 5. С. 68–77.
- Bostrom K. H., Simu K., Hagstrom A., Riemann L. Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis // *Limnol. Oceanogr.: Methods*. 2004. Vol. 2. P. 365–373.
- Schauer M., Massana R., Pedros-Alio C. Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2000. Vol. 33. P. 51–59.
- Приготовление Т-вектора [Электронный ресурс] // Дата последней модификации: 14/01/06. Режим доступа: [http://molbiol.ru/protocol/12\\_05](http://molbiol.ru/protocol/12_05) (дата обращения 28.06.2010).
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 2.
- Трусова М. Ю., Гладышев М. И. Экспериментальное определение органических субстратов, утилизируемых некультивируемым бактериопланктоном эвтрофного водохранилища // *Докл. АН*. 2006. Т. 409, № 1. С. 136–138.
- Trusova M. Yu., Gladyshev M. I. Phylogenetic diversity of winter bacterioplankton of eutrophic Siberian reservoirs as revealed by 16S rRNA gene sequences // *Microb. Ecol.* 2002. Vol. 44. P. 252–259.
- Glöckner F. O., Zaichikov E., Belkova N., Denissova L., Pernthaler J., Pernthaler A., Amann R. Comparative 16S rRNA analysis of lake bacterioplankton reveals globally distributed phylogenetic clusters including an abundant group of actinobacteria // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66, N 11. P. 5053–5065.
- Pommier T., Canbäck B., Riemann L., Boström K. H., Simu K., Lundberg P., Tunlid A., Hagström A. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton // *Mol. Ecol.* 2007. Vol. 16, N 4. P. 867–880.
- Muyzer G., de Waal E. C., Uitterlinden A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain



- reaction-amplified genes coding for 16S rRNA // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59, N 3. P. 695–700.
25. Giovannoni S. J., Stingl U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton // Nature. 2005. Vol. 437. P. 343–348.
26. Вернадский В. И. Живое вещество. М.: Наука, 1978. 358 с.
27. Дегерменджи А. Г., Гладышев М. И. Природные воды, математические модели // Вестн. РАН. 1995. Т. 65, № 9. С. 807–810.
28. Degermendzhi A. G. // Aquatic Ecology. 2010 (in press).

## Consumption of Amino Acids by Non-Cultivated Bacterioplankton of an Eutrophic Water Reservoir

O. V. KOLMAKOVA, M. Yu. TRUSOVA\*

*Siberian Federal University  
660041, Krasnoyarsk, Svobodny ave., 79*

*\*Institute of Biophysics of Siberian Branch RAS  
660036, Krasnoyarsk, Akademgorodok  
E-mail: mtrusova@ibp.krasn.ru*

Species (clones) of the water-reservoir bacterioplankton living on lysine and glycine were revealed in the experimental microsystems using unsterile cultivation. The structure of the community was analyzed using the separation of amplified fragments of the 16S pRNA gene of the bacteria under the conditions of denaturing gradient gel electrophoresis. Identification of the dominant species (clones) of bacterioplankton was carried out using molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of the region of 16S gene of ribosomal RNA. It was discovered that glycine, one of the prevailing amino acids of an eutrophic water reservoir, and lysine, with its lower content in natural water, served as nutrition substrates for different subdominant species (clones) of bacterioplankton. So, it was established that the species of free-living bacterioplankton are narrow-specialized with respect to the consumption of separate amino acids.

**Key words:** free-living non-cultivated bacterioplankton, amino acids, PCR-DGGE, microecosystems, 16S ribosomal RNA.