

СООБЩЕСТВА БАКТЕРИЙ В ПЕРИОД МАССОВОГО ПОДЛЕДНОГО РАЗВИТИЯ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ

© 2017 г. М. В. Башенхаева*, Ю. Р. Захарова, Ю. П. Галачянц, И. В. Ханаев, Е. В. Лихошвай

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

*e-mail: maria.bashenkhaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 18.07.2016 г.

Исследовано таксономическое разнообразие бактерий в период массового подледного развития динофлагеллят *Gymnodinium baicalense* в озере Байкал. В подледный период 2013 г. показатели численности и биомассы *G. baicalense* были на несколько порядков выше по сравнению с данными предыдущих лет, максимальные значения составили, соответственно, $8,9 \times 10^6$ кл./л и 405 г/м³. Таксономическая структура бактериальных сообществ определена на основе анализа данных, полученных пиросеквенированием по технологии 454 (“Roche”) (программа Mothur 1.19.0). Выявлено доминирование представителей трех филумов *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Массовое развитие динофлагеллят приводит к значительному снижению богатства и разнообразия бактериальных сообществ по сравнению с данными проведенных ранее многолетних исследований.

Ключевые слова: озеро Байкал, динофлагелляты, подледные бактериальные сообщества, таксономический состав, пиросеквенирование

DOI: 10.7868/S0026365617040036

В водных экосистемах подо льдом на границе раздела фаз “вода–лед” образуется сложная динамичная среда, в которой за счет низкой температуры, воздействия подледных течений, изменения концентрации питательных веществ, различной освещенности в зависимости от толщины снежного покрова формируются микробные сообщества, включающие бактерии, микроводоросли и динофлагелляты.

Динофлагелляты – это одноклеточные организмы, относящиеся к надтипу *Alveolata*, которые занимают второе место после диатомовых водорослей в образовании первичной продукции водоемов (Белякова и соавт., 2006). Для подледного периода характерно массовое цветение динофлагеллят как в морских (Spilling, 2007), так и в пресноводных водоемах (Phillips, Fawley, 2002), в том числе и в озере Байкал (Вотинцев и соавт., 1975; Bashenkhaeva et al., 2015). В Байкале отмечается развитие эндемичных видов *Gymnodinium baicalense* Antip. и *Peridinium baicalense* Kiss. et Zwetkoff (Помазкина и соавт., 2010), вклад которых в годовую первичную продукцию фитопланктона может достигать 65% (Вотинцев и соавт., 1975). В сообществе с динофлагеллятами подо льдом развиваются и бактерии (Bowman et al., 1997), общая численность которых, несмотря на низкую температуру, на несколько порядков выше, чем в водной толще (Smith et al., 1989), что связано с

интенсивной вегетацией микроводорослей на границе “вода–лед”.

Взаимодействия морских динофлагеллят и бактерий, их влияние на развитие друг друга изучаются в последние годы в лабораторных условиях, и установлены как симбиотические (Tilney et al., 2014), так и антагонистические (Zhang et al., 2015) взаимодействия. Для роста и развития *G. catenatum* в период от прорастания цист до интенсивного цветения необходимы бактерии (Bolch et al., 2011), также они способны стимулировать продукцию токсинов у данного вида динофлагеллят (Albinsson et al., 2014). Известно, что динофлагелляты *Gymnodinium* sp. способны использовать бактерии *Synechococcus* sp. в качестве объекта питания (Jeong, 1999). Ранее нами был изучен таксономический состав и структура бактериальных подледных сообществ, при доминировании разных видов микроскопических эукариот (Bashenkhaeva et al., 2015). Было показано, что таксономический состав бактерий в подледных сообществах не зависит от видов диатомей или динофлагеллят, однако относительное обилие доминирующих бактериальных фил изменятся в зависимости от мест отбора проб и периода развития сообществ.

В данной работе мы исследовали биоразнообразие бактериальных сообществ в период интенсивного подледного развития динофлагеллят *G. baicalense* в Южной котловине озера Байкал, используя метод массового параллельного пиро-

секвенирования V3–V4 петли 16S рРНК. Были поставлены следующие вопросы: 1) Доминируют ли определенные бактериальные таксоны во время всего цветения динофлагеллят? 2) Изменяется ли таксономический состав бактерий в течение развития динофлагеллят в подледных сообществах озера Байкал?

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отбор проб. Было отобрано 15 образцов воды с нижней поверхности льда в Южном Байкале в районе поселка Большие Коты на 4 станциях: в литоральной зоне (ЛЗ) на расстоянии 80 м от берега, глубина озера в месте отбора составляла 5–40 м; склоновой зоне (СЗ), на расстоянии 200 м, глубина озера в месте отбора – 250 м; глубоководной зоне (ГЗ) – 1 км от берега, глубина озера составляла 600 м и пелагической зоне (ПЗ) – 6 км от берега, глубина озера – 1000 м в конце февраля (26/02), середине (13/03) и конце (28/03) марта и в начале апреля (10/04) 2013 г. (таблица). Пробы были отобраны водолазами при помощи шприцев в стерильные бутылки объемом 2 л. В пределах одной станции отбиралась интегральная проба с площади около 70–100 м².

Видовой состав, численность и биомассу динофлагеллят и микроводорослей анализировали с помощью светового микроскопа AxioStarPlus (“Zeiss”, Германия), расчеты численности и биомассы проводили по общепринятой методике, как описано нами ранее (Bashenkhayeva et al., 2015).

Выделение суммарной ДНК проводили, используя лизоцим, 10% SDS и фенол-хлороформную экстракцию, как описано ранее (Bashenkhayeva et al., 2015).

Пиросеквенирование. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, кодирующего V3–V4 петлю, проводили с использованием универсальных праймеров U341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) и U785R (GGACTACCVGGGTATCTAAKCC) и программы: 96°C – 3 мин; 96°C – 30 с; 55°C – 30 с; 72°C – 40 с (30 циклов); 72°C – 10 мин. Ампликоны, полученные в четырех повторностях, объединяли в один образец. Пиросеквенирование осуществляли на платформе GS FLX 454 “Roche” (США) с использованием реагентов серии Titanium по протоколу “GS FLX Titanium Sequencing Method Manual” в соответствии с рекомендациями производителя.

Анализ данных пиросеквенирования проводили при помощи программного пакета Mothur 1.35.1 (<http://www.mothur.org>). Полученные последовательности анализировали по алгоритму Ругоноисе для устранения ошибок, отбирали последовательности протяженностью более 150 п.н. Полученные последовательности выравнивали на бактериальные гены 16S рРНК из базы данных Silva

[http://www.mothur.org/wiki/Silva_reference_files]. Пре-кластеризацию осуществляли для упрощения набора данных путем группировки последовательностей, отличающихся на два нуклеотида. Выявление химерных последовательностей проводили по алгоритму UCHIME со стандартными параметрами. Для таксономического анализа классификацию полученных чтений проводили по таксономии Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2009) при доверительном пороге 80%. Полученные последовательности были сгруппированы в оперативные таксономические единицы (ОТЕ) с генетической дистанцией 0.03. Индексы биоразнообразия (Chao1 (богатство), Shannon (разнообразие)) были просчитаны на основе выявленных ОТЕ. Таксономическую идентификацию 27 наиболее многочисленных ОТЕ (общее количество последовательностей не ниже 276) проводили в результате их сравнения с нуклеотидными последовательностями 16S рРНК из базы данных GenBank с помощью программы BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Филогенетическое дерево построено с использованием метода максимального правдоподобия (Likelihood) с Kimura two-parameters алгоритмом в программе MEGA версия 6. Данные были депонированы в архив GenBank, секцию (SRA) под номером доступа SRR3999046.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Видовой состав, численность и биомасса динофлагеллят. В подледный период 2013 г. покрытие поверхности льда снегом (заснеженность ледового покрова) в районе работ составляло в литоральной и склоновой зонах в конце февраля и в марте 80%, в начале апреля 100%; в глубоководной и пелагической около 30–50%. Подо льдом были выявлены сообщества с доминированием динофлагеллят *Gymnodinium baicalense* Antip. В конце февраля подледные обрастания имели буровато-коричневую окраску и образовывали структурированные линии на нижней поверхности льда. В марте обрастания начинали отходить от поверхности льда и к началу апреля вода (больше метра от нижней границы льда) была окрашена в коричневый цвет, имея в верхнем подледном горизонте четко выраженную границу с прозрачным слоем воды. В конце февраля в литоральной зоне биомасса *G. baicalense* составляла 98.05 г/м³, постепенно увеличиваясь, в начале апреля достигла максимума 388.33 г/м³ (рис. 1; таблица). В склоновой и глубоководной зонах биомасса в начале вегетации была равна 125.08 и 141.22 г/м³, в середине марта значения биомассы снизились, однако к апрелю снова возросли, достигая наибольших значений 405.01 и 283.6 г/м³. В пелагической зоне в начале марта были отмечены наименьшие значения биомассы 283.6 г/м³, пик при-

Численность и биомасса динофлагеллят *G. baicalense* и данные пироксвенирования V3–V4 участка гена 16S рРНК

Зона отбора проб	Дата отбора проб	Численность, $\times 10^6$ кл./л	Биомасса, г/м ³	Число последовательностей	Генетическая дистанция 0.03			Good coverage, %
					OTE	Chao1	Shannon index	
Литоральная зона (50 м от берега)	26/02/2013	2.2	98.05	2622	142	303.65 (248.14; 406.46)	2.74 (2.69; 2.78)	98.9
	13/03/2013	3.1	141.49	983	91	162.56 (137.76; 216.97)	3.32 (3.25; 3.39)	98.0
	28/03/2013	5.6	255.82	5134	122	242.81 (195.28; 340.22)	3.02 (2.98; 3.06)	99.2
	10/04/2013	8.6	388.33	6514	126	266.07 (208.11; 383.87)	2.98 (2.94; 3.01)	99.2
Склоновая зона (200 м от берега)	26/02/2013	2.8	125.08	2307	73	180.46 (142.25; 265.39)	1.74 (1.7; 1.78)	99.6
	13/03/2013	3.2	146.4	884	72	137.75 (110.54; 202.84)	3.23 (3.16; 3.31)	97.5
	28/03/2013	1.5	67.55	353	52	104.83 (84.43; 156.23)	2.73 (2.62; 2.84)	96.7
	10/04/2013	8.9	405.01	77	22	—	—	94.3
Глубоководная зона (1 км от берега)	26/02/2013*	0.3	7.17	7657	136	293.06 (232.32; 413.98)	2.86 (2.83; 2.89)	99.4
	13/03/2013	3.1	141.22	964	66	154.11 (115.03; 249.72)	2.1 (2.03; 2.16)	98.9
	28/03/2013	1.01	45.96	870	84	148.00 (124.18; 203.05)	2.8 (2.71; 2.88)	98.2
	10/04/2013	6.3	283.6	34	9	—	—	76.5
Пелагическая зона (6 км от берега)	13/03/2013	0.05	2.18	1310	73	132.91 (110.56; 189.57)	3.06 (3.0; 3.12)	98.7
	28/03/2013	6.02	274.32	449	63	119.60 (94.89; 182.75)	2.94 (2.83; 3.06)	96.7
	10/04/2013	1.3	60.6	1244	91	180.53 (143.63; 255.64)	2.3 (2.18; 2.41)	96.1

Звездочкой (*) отмечена станция, где развивались диатомовые водоросли *Aulacoseira baicalense*

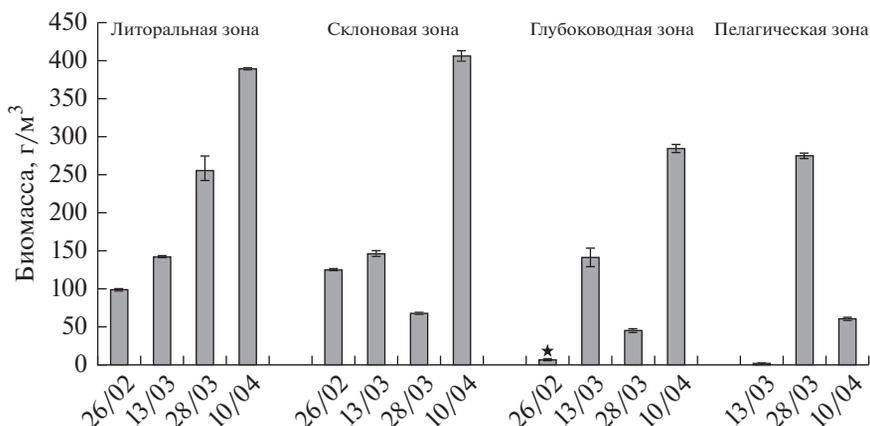


Рис. 1. Биомасса динофлагеллят подледных сообществ 2013 г.; звездочкой отмечена станция, где развивались диатомовые водоросли *Aulacoseira baicalensis*.

ходил на середину марта 283.6 г/м³, и к началу апреля происходило уменьшение биомассы.

Следует отметить, что диатомовые водоросли *Aulacoseira baicalensis* (K.I. Meyer) Simonsen, цветение которых характерно для данного периода в озере Байкал (Bondarenko et al., 2006; Поповская и соавт., 2011) были отмечены лишь на одной станции глубоководной зоны в конце февраля (рис. 1, таблица). В качестве минорных компонентов (доля которых составляла не более 3%) в состав сообществ входили: динофлагелляты *G. coeruleum* Dogiel, *Peridinium baicalense* Kiselev & Svetkov и *P. eurycaps* K. Rengefors & B. Meyer; диатомеи *Nitzschia graciliformis* Lange-Bertalot & Simonsen, *Synedra acus* subsp. *radians* (Kütz.) Skabitsch., *A. islandica* (O. Müller) Simonsen и *Cyclotella minuta* (Skvortzov) Antipova; зеленые водоросли *Monoraphidium arcuatum* (Korshikov) Hindák, *M. contortum* (Thuret) Komárková-Legnerová, *M. griffithii* (Berkeley) Komárková-Legnerová и *Chlorella vulgaris* Beyenick [Beijerinck]; и криптофитовые *Cryptomonas* sp.

Оценка разнообразия бактерий подледных сообществ. В результате пиросеквенирования V3–V4 участков гена 16S рРНК 15 подледных образцов и последующей обработки данных, включающей выравнивание, пре-кластеризацию, удаление химерных последовательностей, было получено 31409 последовательностей, относящихся к домену *Bacteria*, средняя длина последовательностей составляла 268 п.н. Для последующего анализа из-за низкого количества последовательностей были исключены образцы С310/04 и Г310/04. Количество последовательностей варьировало от 353 до 7658 на образец. Всего было выявлено 408 ОТЕ_{0.03}, количество ОТЕ на образец варьировало от 52 до 142. Значения покрытия (Good coverage) были высокие для всех образцов (от 94.3 до 99.6%), что говорит о достаточно полной оценке таксономического разнообразия (таблица). Зна-

чения индекса Chao1 (богатство) варьировали от 104.83 до 303.65, индекса разнообразия Shannon от 1.74 до 3.32 (таблица). Наиболее таксономически сложные сообщества бактерий по данным индексов разнообразия были в литоральной зоне в конце февраля и начале марта. В периоды развития сообществ происходит снижение их богатства, что подтверждается изменением индекса Chao1 во всех зонах, кроме пелагической, в которой значения индекса наоборот увеличиваются.

Состав бактериальных сообществ. Таксономический состав бактериальных сообществ исследованных образцов представлен на рис. 2. Классифицированные последовательности были отнесены к 14 филумам, 54 семействам и 128 родам. По количеству последовательностей во всех образцах суммарно наибольшие доли принадлежали к филумам *Bacteroidetes* (37.9%), *Proteobacteria* (31.7%), *Actinobacteria* (19.1%), *Verrucomicrobia* (4.3%) и *Deinococcus-Thermus* (3.9%). Доля представителей филумов TM7, *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Planctomycetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes* и SR1 составляла от 1% и менее последовательностей.

Представители *Bacteroidetes* в течение исследуемого периода в разных образцах распределены равномерно, однако количество последовательностей в пелагической зоне значительно ниже по сравнению с другими станциями. Наибольшая доля *Bacteroidetes* на всех исследуемых станциях приходится на ранний период (конец февраля–начало марта), затем происходит снижение их доли к началу апреля (рис. 2а). Можно предположить, что снижение доли *Bacteroidetes* происходит при увеличении биомассы динофлагеллят, что наиболее четко прослеживается в литоральной зоне. В результате таксономического анализа индивидуальные последовательности из каждого образца были отнесены к филотипам на основе

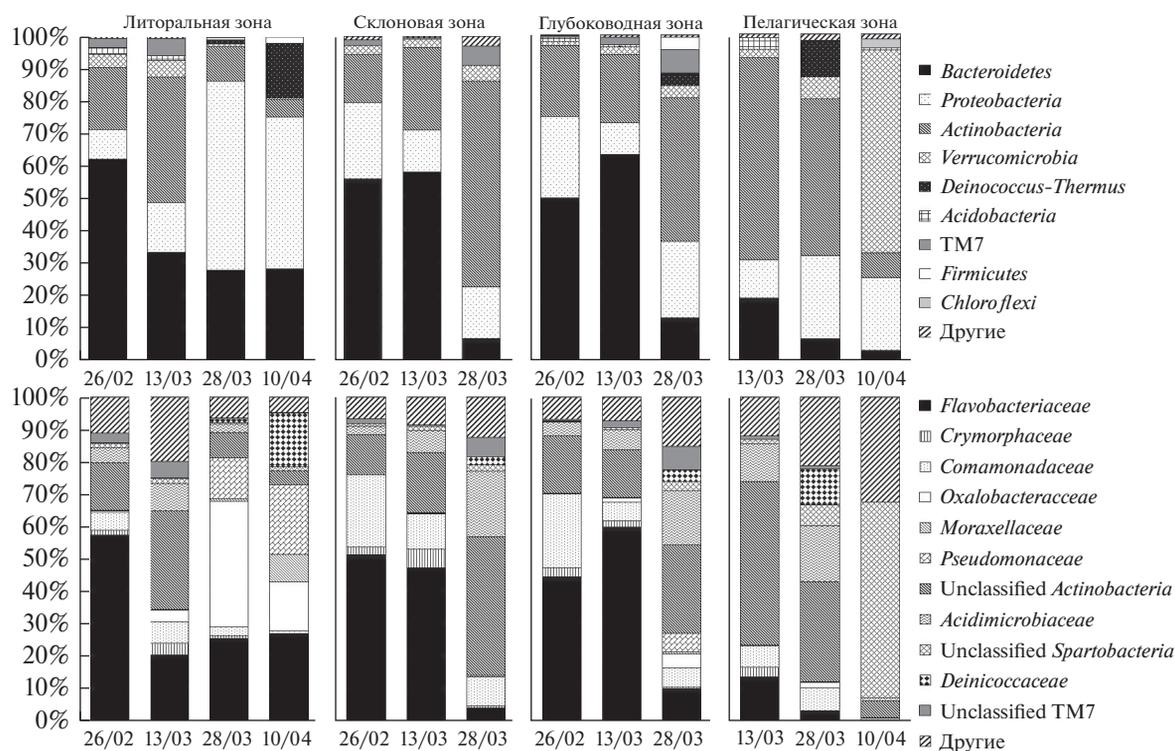


Рис. 2. Таксономический состав бактериальных последовательностей подледных сообществ на уровне филумов (а), на уровне семейства (б).

полноразмерных последовательностей гена 16S рРНК из базы данных GenBank. Среди 27 наиболее многочисленных ОТЕ 11 отнесены к филуму *Bacteroidetes*, из которых 9 ОТЕ принадлежали к семейству *Flavobacteriaceae* и по 1 ОТЕ к семействам *Cryomorphaceae* и *Chitinophagaceae*. Ближайшими гомологами ОТЕ019 и ОТЕ025 были *Flavobacterium psychrolimnae* из озера Мичиган (JX287711) и *Flavobacterium psychrolimnae* из антарктического озера (AJ585427) (рис. 3). ОТЕ022 имела сходство (100%) с антарктической бактерией (AJ440977) и некультивируемой *Flavobacterium* sp. высокогорного озера Тибетского нагорья (EU703408); ОТЕ009 и ОТЕ013 показали высокое сходство (100%) с пресноводной *Flavobacterium* sp. (KF499997) и с некультивируемой бактерией семейства *Flavobacteriaceae* из озера Мичиган (EU642364) (рис. 3). ОТЕ023 имела 100% сходство с некультивируемой бактерией семейства *Cryomorphaceae* (FN668164) и с некультивируемой *Fluviicola* sp. высокогорного озера Тибетского нагорья (EU703457).

В подледных сообществах Байкала в литоральной и пелагической зонах происходит увеличение доли в сообществах представителей *Proteobacteria* с конца февраля до начала апреля. В склоновой и глубоководной зонах доля данного филума изменяется незначительно. Доминируют последовательности представителей класса β -*Proteobacteria* (20.7%): семейства *Oxalobacteraceae* (9.8%), *Coma-*

monadaceae (9.7%) и другие (1.2%). Почти вдвое была меньше доля класса γ -*Proteobacteria* (9.3%), среди которых семейства *Pseudomonadaceae* (6.7%) и *Moraxellaceae* (1.9%). Класс α -*Proteobacteria* составляет 1.4%, из которых наибольшая доля относится к семействам *Caulobacteraceae*, *Sphingomonadaceae* и *Rhodobacteraceae*. Среди многочисленных ОТЕ к филуму *Proteobacteria* относится 5 ОТЕ. На филогенетическом дереве данные ОТЕ кластеризуются с представителями *Massilia* sp. из кернов льда (KF295189) – ОТЕ004; представителями *Limnohabitans* sp. (KT175907) и *Limnohabitans curvus* (HE600681) – ОТЕ024; с антарктическими бактериями, некультивируемыми бактериями подледного метанового сипа и некультивируемыми бактериями высокогорных озер и *Rhodofera antarcticus* – ОТЕ005. Ближайшими гомологами представителей семейств *Pseudomonadaceae* и *Moraxellaceae* являются *Pseudomonas psychrophila* (AB041885) и *Pseudomonas psychrotolerans* (AJ575816) для ОТЕ006, и *Acinetobacter* sp. (KM979185) и некультивируемый *Acinetobacter* sp. из донных осадков озера Дракон (Китай) (JF733705) для ОТЕ021 (рис. 3).

Как видно из рис. 2, доля филума *Actinobacteria* в период исследования в литоральной и пелагической зонах снижается, в то время как в склоновой и глубоководной зонах увеличивается. Около 9.4% принадлежит к неклассифицированным *Actinobacteria* и 4.5% к семейству *Acidimicrobiaceae*.

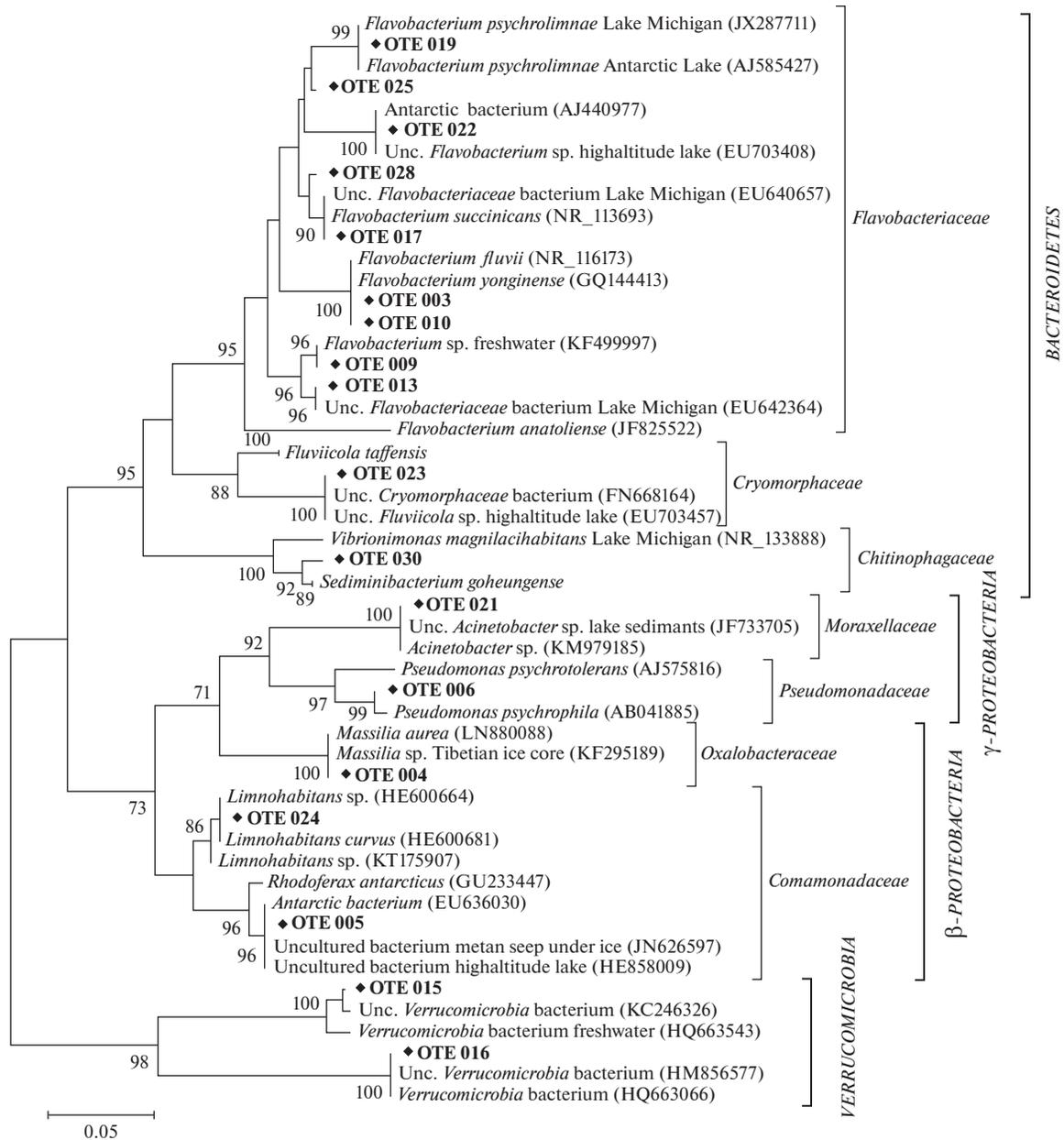


Рис. 3. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей наиболее многочисленных ОТЕ, относящихся к филумам *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*, с генетической дистанцией 0.03 из подледных сообществ озера Байкал, при массовом развитии динофлагеллят *G. baicalense*, построенное с использованием метода максимального правдоподобия (Likelihood) с алгоритмом Kimura two-parameters. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap”-анализа 1000 альтернативных деревьев (значимыми признаются значения больше 70).

Наиболее многочисленные ОТЕ, относящиеся к филуму *Actinobacteria*, сходны (97–100%) с некультивируемыми бактериями из озера Онтарио (KM031281), представителем *Actinobacterium* из мерзлого грунта (JN897005), некультивируемыми представителями *Actinomycetales* из озера Мичиган (EU641194) и высокогорных озер Тибетского плато (EU703381), а также *Ilumatobacter fluminis* (JQ899217) (рис. 4).

В литоральной зоне доля филума *Verrucomicrobia* по мере развития сообщества снижается в отличие от пелагической зоны, в которой в конце апреля отмечена наибольшая доля представителей данного филума (57.5% от состава сообщества). Данный филум представлен в основном неклассифицированными последовательностями. Среди наиболее многочисленных ОТЕ к *Verrucomicrobia* относятся 2 ОТЕ, ближайшими гомо-

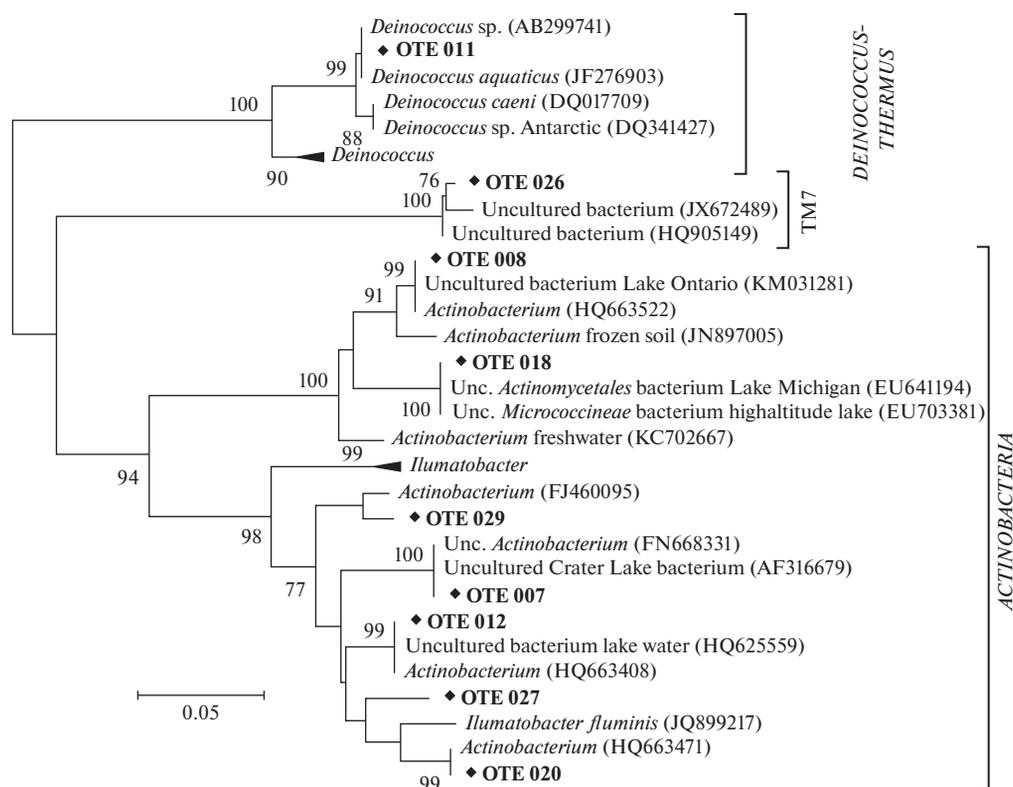


Рис. 4. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей наиболее многочисленных ОТЕ, относящихся к филумам *Deinooccus-Thermus*, TM7 и *Actinobacteria* с генетической дистанцией 0.03 из подледных сообществ озера Байкал, при массовом развитии динофлагеллят *G. baicalense*, построенное с использованием метода максимального правдоподобия (Likelihood) с алгоритмом Kimura two-parameters. Цифрами показана достоверность ветвления, установленная с помощью “bootstrap” – анализа 1000 альтернативных деревьев (значимыми признаются значения больше 70).

логами которых (97–100%) являются представители *Verrucomicrobia* пресноводных водоемов (HQ663543) и некультивируемые *Verrucomicrobia* (KC246326, NM856577, HQ663066) (рис. 3).

Доля филума *Deinooccus-Thermus* на всех исследуемых станциях увеличивается к концу марта. В литоральной зоне в начале апреля отмечается наибольшая доля *Deinooccus-Thermus*. На филогенетическом дереве ближайшими родственниками для наиболее представленной ОТЕ011 являются *Deinococcus aquaticus* (JF276903), *Deinococcus* sp. (AB299741), *Deinococcus caeni* (DQ017709) и *Deinococcus* sp. из Антарктики (DQ341427) (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

В подледный период 2013 г. в Южном Байкале в районе поселка Большие Коты были выявлены сообщества с доминированием динофлагеллят *Gymnodinium baicalense* Antip. Данный вид описан как холодолюбивый байкальский эндемик и специфичный для подледного периода (Оболкина и соавт., 2000). Массовое развитие динофлагеллят подо льдом также было отмечено ранее. Однако в

предыдущие годы в подледный период значения биомассы *G. baicalense* были в несколько раз меньше и составляли 1–100 г/м³ (Вотинцев и соавт., 1975; Анненкова и соавт., 2009; Помазкина и соавт., 2010; Bashenkhayeva et al., 2015). Интенсивное развитие динофлагеллят в литоральной и склоновой зонах может быть связано с сильной заснеженностью озера в этих районах. Как это, например, показано в сообществе нижней поверхности льда в заливе Франклина (море Ботфорда, Канада), где при наиболее высоком снежном покрове доминируют динофлагелляты (Rózańska et al., 2009). Кроме того, многие динофлагелляты приспособлены к миксотрофному питанию и при недостаточной освещенности из-за повышенной заснеженности, в качестве источника органического вещества могут потреблять бактерий (Kirchner et al., 1996), таким образом, приспособившись к условиям обитания.

Данные пиросеквенирования V3–V4 участков гена 16S рРНК показали, что подледные сообщества с доминированием динофлагеллят отличаются низким богатством и разнообразием бактерий в сравнении с ранее исследованными сообществами.

ми, где развивались разные виды микроводорослей, где значения индекса Chao1 варьирует от 941 до 6477 (Bashenkhaeva et al., 2015). По данным индексов Chao1 и Shannon сообщества литоральной зоны конца февраля и начала марта были наиболее таксономически разнообразны. В прибрежной зоне за счет влияния дна и из-за неоднородности покрытия льда снегом могут образовываться подледные течения (Жданов и соавт., 2002), которые, перемешивая водную массу, скорее всего способны влиять на увеличение разнообразия микроорганизмов относительно других зон.

Во всех исследуемых нами образцах были идентифицированы бактерии филума *Bacteroidetes*. Представители данного филума являются одними из доминирующих таксонов в сообществах холодноводных морей (Zhang et al., 2014; Li et al., 2015), а также в озере Байкал в период ледостава (Ahn et al., 1999; Bashenkhaeva et al., 2015). Кроме того, представители *Bacteroidetes* одни из распространенных таксонов, связанных с цветением морских динофлагеллят (Garcés et al., 2007; Green et al., 2010). При интенсивном цветении *Alexandrium taylori* в летний период наблюдали максимальную долю *Bacteroidetes* в сообществах, при уменьшении численности динофлагеллят снижалась и доля *Bacteroidetes* (Garcés et al., 2007). В исследуемых нами сообществах большинство *Bacteroidetes* принадлежало семейству *Flavobacteriaceae* (34%) (рис. 2б). Представители данного семейства широко распространены в различных экотопах, они найдены в почве, пресноводных водоемах, в арктических регионах (Li et al., 2015), а также доминируют в планктоне литоральной зоны Байкала (Парфенова с соавт., 2013). Кроме того, ряд таксонов *Flavobacteriaceae* является психрофилами, которые за счет производства пигментов и высокого содержания жирных кислот обладают защитными свойствами, что позволяет им обитать в холодных экотопах (по Garrity, 2005). Семейство *Cryomorphaceae*, чьи представители были также идентифицированы в наших образцах, широко распространено в водных экосистемах, кроме того, большинство культивируемых видов изолированы из холодных мест обитания (Bowman et al., 2003).

Бактерии филума *Proteobacteria* также были идентифицированы во всех образцах, в основном классы β - и γ -*Proteobacteria*. Некоторые представители рода *Pseudomonas* (γ -*Proteobacteria*) являются психрофилами и обладают механизмами для выживания в экстремальных условиях (Muryoi et al., 2004), кроме того, ранее чистые культуры рода *Pseudomonas* были изолированы из подледных сообществ Байкала (Bashenkhaeva et al., 2015). В сообщества с доминированием динофлагеллят также отмечена высокая доля *Proteobacteria*, но в основном представителей класса α -*Proteobacteria*

и небольшая доля γ -*Proteobacteria* (Green et al., 2004; Garcés et al., 2007).

В состав сообществ входили представители филумов *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Deinococcus-Thermus*. Бактерии данных филумов имеют широкий ареал обитания и распространены в сообществах арктических почв, морских и пресноводных водоемах (Zhang et al., 2014) и известны как деструкторы органических веществ (по Garrity, 2005). Кроме того, выявлено, что бактерии рода *Deinococcus*, при массовом развитии морских токсичных динофлагеллят, способны выделять дейноксантин — альгицидный компонент, который снижает численность динофлагеллят (Li et al., 2015). Однако в случае байкальских подледных сообществ при максимальной биомассе динофлагеллят доля в сообществах представителей семейства *Deinococcaceae* наибольшая.

Таким образом, в подледный период 2013 г. в озере Байкал (Южная котловина) было необычно массовое развитие динофлагеллят *Gymnodinium baicalense*, численность и биомасса которых были в несколько раз выше, чем в предыдущие годы. При массовом развитии динофлагеллят происходит значительное снижение богатства и разнообразия бактериальных сообществ. Во время цветения динофлагеллят в составе бактериальных сообществ доминировали филумы *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Наиболее многочисленным семейством было семейство *Flavobacteriaceae* (около 30% от общего числа последовательностей). Последовательное изменение доминирующих таксонов бактерий при развитии динофлагеллят прослеживается в литоральной зоне, в отличие от склоновой, глубоководной и пелагической зон. Происходит снижение доли филумов *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* и увеличение *Proteobacteria*. Интересно, что эти же филумы доминируют в составе сообществ и при цветении морских динофлагеллят (Garcés et al., 2007; Green et al., 2010).

Работа выполнена в рамках темы Федерального агентства научных организаций (ФАНО) “Экспериментальные исследования геномов и протеомов” № 0345-2014-0006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анненкова Н.В., Бельх О.И., Деникина Н.Н., Беликов С.И. Идентификация представителей динофлагеллят озера Байкал на основе молекулярно-генетических данных // ДАН. 2009. Т. 426. № 4. С. 559–562.
- Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасова К.Л. Ботаника. Т. 1. Водоросли и грибы. М.: Издательский центр “Академия”, 2006. 320 с.
- Вотинцев К.К., Мещерякова А.И., Поповская Г.И. Круговорот органического вещества в озере Байкал. Новосибирск: Наука, 1975.

- Жданов А.А., Гранин Н.Г., Шимараев М.Н. Подледные течения Байкала (на основе новых экспериментальных данных) // География и природные ресурсы. 2002. № 1. С. 79–83.
- Оболкина Л.А., Бондаренко Н.А., Дорощенко Л.Ф., Горбунова Л.А., Моложжвая О.А. О находке криофильного сообщества в озере Байкал // ДАН. 2000. Т. 371. № 6. С. 815–817.
- Помазкина Г.В., Белых О.И., Домышева В.М., Сакирко М.В., Гнатовский Р.Ю. Структура и динамика фитопланктона в южном Байкале (Россия) // Альгология. 2010. Т. 20. № 1. С. 56–72.
- Поповская Г.И., Генкал С.И., Лихошвай Е.В. Диатомовые водоросли планктона озера Байкал. Атлас-определитель. Новосибирск: Наука, 2011. 192 с.
- Ahn T., Hong S., Kim D., Suck J., Drucker V.V. The bacterial community of Southern Lake Baikal in winter // J. Microbiol. 1999. V. 37. P. 10–13.
- Albinsson M.E., Negri A.P., Blackburn S.I., Bolch C.J.S. Bacterial community affects toxin production by *Gymnodinium catenatum* // PLoS One. 2014. V. 9. № 8. e104623. doi 10.1371/journal.pone.0104623
- Bashenkhaeva M.V., Zakharova Y.R., Petrova D.P., Khanaev I.V., Galachyants Y.P., Likhoshway Y.V. Sub-ice microalgal and bacterial communities in freshwater Lake Baikal, Russia // Microb. Ecol. 2015. V. 70. P. 751–765.
- Bashenkhaeva M.V., Zakharova Y.R., Khanaev I.V. Psychrophilic bacteria in sub-ice communities of Lake Baikal // Goldschmidt2015 Abstracts. 2015. 221 p.
- Bolch C.J.S., Subramanian T.A., Green D.H. The toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) requires marine bacteria for growth // J. Phycol. 2011. V. 47. P. 1009–1022.
- Bondarenko N.A., Timoshkin O.A., Röpstorf P., Melnik N.G. The under-ice and bottom periods in the life of *Aulacoseira baicalensis* (K. Meyer) Simonsen, a principal Lake Baikal alga // Hydrobiologia. 2006. V. 568. P. 107–109. doi 10.1007/s10750-006-0325-7
- Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S., McMeekin T.A. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 3068–3078.
- Bowman J.P., Mancuso C., Nichols C.M., Gibson J.A.E. *Algoriphagus ratkowskyi* gen. nov., sp. nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp. nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp. nov. and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp. nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1343–1355.
- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B. The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 141–145.
- Garcés E., Vila M., Reñé A., Alonso-Sáez L., Anglès S., Lugliè A., Masó M., Gasol J.M. Natural bacterioplankton assemblage composition during blooms of *Alexandrium* spp. (Dinophyceae) in NW Mediterranean coastal waters // Aquat. Microb. Ecol. 2007. V. 46. P. 55–70.
- Garrity G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology I–II. New York: Springer Verlag, 2005.
- Green D.H., Llewellyn L.E., Negri A.P., Blackburn S.I., Bolch C.J.S. Phylogenetic and functional diversity of the cultivable bacterial community associated with the paralytic shellfish poisoning dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 47. P. 345–357.
- Green D.H., Hart M.C., Blackburn S.I., Bolch C.J.S. Bacterial diversity of *Gymnodinium catenatum* and its relationship to dinoflagellate toxicity // Aquat. Microb. Ecol. 2010. V. 61. P. 73–87.
- Jeong H.J. The ecological roles of heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic community // J. Eukaryot. Microbiol. 1999. V. 46. № 4. P. 190–396.
- Kirchner M., Sahling G., Uhlig G., Gunkel W., Klings K.-W. Does the red tide-forming dinoflagellate *Noctiluca scintillans* feed on bacteria? // Sarsia. 1996. V. 81. P. 45–55. doi 10.1080/00364827.1996.10413610
- Li Y., Liu Q., Li C., Dong Y., Zhang W., Zhang W., Xiao T. Bacterial and archaeal community structures in the Arctic deep-sea sediment // Acta Oceanol. Sinica. 2015. V. 34. P. 93–113.
- Li Y., Zhua H., Lei X., Zhanga H., Guana C., Chena Z., Zhenga W., Xua H., Tiana Y., Yub Z., Zheng T. The first evidence of deinoxanthin from *Deinococcus* sp. Y35 with strong algicidal effect on the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* // J. Hazardous Materials. 2015. V. 290. P. 87–95.
- Muryoi N., Sato M., Kaneko S., Kawahara H., Obata H., Yaish M.W.F., Griffith M., Glick B.R. Cloning and expression of *afpA*, a gene encoding an antifreeze protein from the Arctic plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 5661–5671.
- Phillips K.A., Fawley M.W. Winter phytoplankton blooms under ice associated with elevated oxygen levels // J. Phycol. 2002. V. 38. P. 1068–1073.
- Różańska M., Gosselin M., Poulin M., Wiktor J.M., Michel C. Influence of environmental factors on the development of bottom ice protist communities during the winter–spring transition // Mar. Ecol. Prog. Ser. 2009. V. 386. P. 43–59. doi 10.3354/meps08092
- Smith R.E.H., Clement P., Cota G.F. Population dynamics of bacteria in Arctic Sea Ice // Microb. Ecol. 1989. V. 17. P. 63–76.
- Spilling K. Dense sub-ice bloom of dinoflagellates in the Baltic Sea, potentially limited by high pH // J. Plankton Res. 2007. V. 29. P. 895–901. doi 10.1093/plankt/fbm067
- Tilney C.L., Pokrzywinski K.L., Coyne K.J., Warner M.E. Growth, death, and photobiology of dinoflagellates (*Dinophyceae*) under bacterial-algicide control // J. Appl. Phycol. 2014. V. 26. P. 2117–2127.
- Zhang J., Zhang X., Liu Y., Xie S., Liu Y. Bacterioplankton communities in a high-altitude freshwater wetland // Annals Microbiol. 2014. V. 64. P. 1405–1411.

Bacterial Communities during the Period of Massive under-Ice Dinoflagellate Development in Lake Baikal

M. V. Bashenkhaeva*, Yu. R. Zakharova, Yu. P. Galachyants, I. V. Khanaev, and Ye. V. Likhoshway

Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

**e-mail: maria.bashenkhaeva@gmail.com*

Received July 18, 2016

Abstract—Taxonomic diversity of Lake Baikal bacteria during the period of massive under-ice development of dinoflagellate *Gymnodinium baicalense* was studied. During the ice-covered period in 2013, both the abundance and biomass of *G. baicalense* were several orders of magnitude higher than the values for previous years, the maximum values were 8.9×10^6 cells/L and 405 g/m³, respectively. The taxonomic structure of bacterial communities was determined using the data obtained by 454 pyrosequencing (Roche) with Mothur 1.19.0. Predominance of three phyla was revealed: *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria*. Massive dinoflagellate development resulted in a considerable decrease in the richness and diversity of bacterial communities compared to the results of the earlier long-term studies.

Keywords: Lake Baikal, dinoflagellates, under-ice bacterial communities, taxonomic composition, pyrosequencing