

УДК 574.583+574.1

РАЗНООБРАЗИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЯ СООБЩЕСТВА ПЛАНКТОННЫХ ПРЕСНОВОДНЫХ ПРОТИСТОВ В ЭСТУАРНОЙ ЗОНЕ ПРИТОКА КРУПНОГО РАВНИННОГО ВОДОХРАНИЛИЩА: МЕТАБАРКОДИНГ ГЕНА 18S-РИБОСОМНОЙ РНК

© 2023 г. М. В. Уманская*, @, М. Ю. Горбунов*, С. В. Быкова*, Н. Г. Тарасова*

*Самарский федеральный исследовательский центр РАН, Институт экологии Волжского бассейна РАН,
ул. Комзина, 10, Тольятти, 445003 Россия

@E-mail: mvumansk67@gmail.com

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 21.10.2022 г.

Принята к публикации 21.10.2022 г.

Представлены первые данные о составе и разнообразии летнего сообщества планктонных протистов Усинского залива и прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища, полученные с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 18S рибосомной РНК. В составе сообщества протистов обнаружено 1150 ОТЕ, среди которых преобладают представители супергруппы SAR (Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria). В полной библиотеке по числу ОТЕ преобладают Stramenopiles, представленные, в порядке убывания, Chrysophyceae (8.5%), Opalozoa (8.3%), Diatomea (4.7%) и Oomycetes (Peronosporomycetes) (3.7%), а по количеству нуклеотидных последовательностей – Alveolata (62.0%) и в первую очередь, Ciliata (56.9%). Выделяются четыре взаимосвязанных сообщества протистов: речного участка, собственно залива, устьевой зоны, и водохранилища вне влияния залива (выше устья). Наиболее контрастными по составу являются сообщества речного участка и участка водохранилища выше устья. В целом, исследованная эстуарная система имеет черты как экотона, так и экотона. Основное влияние на развитие фототрофного компонента эукариотического планктона оказывают конкурентные взаимоотношения с цианобактериями. “Цветение” цианобактерий оказывает влияние и на структуру гетеротрофной части сообщества, хотя это влияние проявляется менее ярко. Развитие Archaeplastida, Rhizaria и минорных групп протистов положительно коррелирует с долей последовательностей Metazoa в пробах, которая отражает интенсивность прессы метазоопланктона. Среди полученных последовательностей обнаружены принадлежащие к таким редким для пресных вод таксонам, как Bolidophyceae и Rhodelphida. Эти находки расширяют биогеографию этих групп, которые пока обнаружены в очень немногих пресноводных водоемах.

Ключевые слова: протисты, планктон, высокопроизводительное секвенирование, таксономический состав, пространственное распределение, Куйбышевское водохранилище, река Уса

DOI: 10.31857/S102634702260039X, **EDN:** TORNMA

Трансформация планктонных сообществ в эстуарных зонах наиболее хорошо изучена в морских и океанических эстуариях, где ведущим фактором, влияющим на состав и структуру сообществ, является градиент солености воды (Attrill, Rundle, 2002; Telezh, Khlebovich, 2010). В значительно меньшей степени исследованы зоны впадения притоков в крупные пресные водоемы, образующие сходные геоморфологические структуры, так называемые “пресноводные эстуарии” (Herdendorf, 1990; Loken *et al.*, 2016). Это касается эстуарных зон притоков не только крупных пресных озер, где преобладают градиенты гидрологических, а не гидрохимических факторов (Fujimoto *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2019), но и крупных искусственных водоемов (водохранилищ), в которых из-за функцио-

нирования гидротехнических сооружений создается сложная динамика уровней воды и течений (Жариков, 2000; Nowak, Ptak, 2018; Obodovskiy *et al.*, 2020), оказывающая своеобразное искусственное приливно-отливное воздействие на эти участки.

Независимо от ведущего фактора, экологические условия по продольному профилю любой эстуарной системы значительно изменяются, что приводит к изменению интенсивности развития и разнообразия водных сообществ (Nowak, Ptak, 2018; Li *et al.*, 2018; Obodovskiy *et al.*, 2020 и др.). Поэтому, наряду с анализом пространственных изменений абиотических факторов, отправной точкой для понимания функционирования эстуарных экосистем, как, впрочем, и любых экосистем вообще (Singer *et al.*, 2021), является опреде-

ление биологического разнообразия и выявление особенностей пространственного распределения отдельных таксономических групп организмов. Протисты (микробные эукариоты, микроэукариоты) составляют существенную часть общего биоразнообразия и играют ключевую роль в структуре и функционировании водных экосистем (Likens, 2010). Они характеризуются очень высоким морфологическим и функциональным разнообразием (Zhao *et al.*, 2020; Singer *et al.*, 2021).

Возможности оценки разнообразия протистов классическими микроскопическими методами довольно ограничены в связи с их малыми размерами, отсутствием ярко выраженных морфологических признаков и сложностями культивирования в лабораторных условиях. Поэтому анализ их состава и разнообразия чаще всего ограничивается фитопланктоном и, несколько реже, инфузориями. Остальные группы (например, “гетеротрофные нанофлагелляты”) чаще всего определяются либо “все вместе”, без таксономического разделения, либо качественно (Косолапов и др., 2016, 2017). Поэтому большое значение для оценки реального разнообразия протистов имеет метод метабаркодинга, основанный на анализе маркерных последовательностей их ДНК (Debroas *et al.*, 2017; Boenigk *et al.*, 2018; David *et al.*, 2021).

Куйбышевское водохранилище — крупнейшее в каскаде водохранилищ р. Волги, бассейн которой охватывает значительную часть Восточной Европы. В пределах водохранилища находится несколько глубоко врезанных заливов, образованных затопленными руслами притоков; наиболее крупными из них являются Свияжский, Черемшанский и Усинский, которые по своей структуре представляют собой типичные пресноводные эстуарии. Фитопланктон и сообщества инфузорий Куйбышевского водохранилища, включая эстуарные участки, в частности Усинский залив, подробно исследовались морфологическими методами (Ротарь, 1995; Фитопланктон Нижней Волги..., 2006; Корнева, 2015; Горохова, Зинченко, 2018; Андреева и др, 2021; Быкова, 2021; Тарасова, Уманская, 2021). Однако только в последнее время появились первые сообщения о метабаркодинговых исследованиях планктонных протистов реки Волга и ее водохранилищ (Тихоненков и др., 2021).

Целью данной работы являлось получение первых данных о составе и разнообразии летнего эукариотического планктона Усинского залива и прилегающей акватории Куйбышевского водохранилища с помощью высокопроизводительного секвенирования гена 18S рибосомной РНК (18S рРНК), а также анализ трансформации сообщества планктонных протистов в системе река-залив-водохранилище.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб и методы анализа факторов среды.

Пробы воды объемом 0.5 л были отобраны в стерильные пластиковые бутылки на шести станциях 30.06.—05.07.2021 г. (табл. 1). На каждой станции пробы отбирали с шагом в один метр по глубине и объединяли в равных объемах в интегральную пробу. Поскольку глубины станций в основной части залива и на речном участке не превышали 10 м, то на более глубоких станциях в устье залива и в водохранилище пробы отбирали только до 10 м включительно. Одновременно портативными приборами были определены основные физико-химические показатели — температура, концентрация растворенного кислорода (оксиметр HI9143, Hanna Instruments, ЕС), pH, Eh (pH-Eh-метр Эксперт-001-4, Россия), электропроводность (кондуктометр CD-4302, Lutron, КНР). Сестон из интегральных проб был осажден последовательным фильтрованием — вначале без давления на нитроцеллюлозные фильтры с номинальным порогом пропускания 3–4 мкм, а затем под давлением 0.5–0.7 атм. — на фильтры с диаметром пор 0.2 мкм. Фильтры с осадками, полученными из одной пробы, были перенесены в одну общую стерильную пробирку, фиксированы 3 мл 80% (v/v) этанола и хранились при –20°C. Таким образом каждая проба сестона содержала все эукариоты, размер которых превышал 0.2 мкм.

Выделение ДНК и высокопроизводительное секвенирование было выполнено в компании Синтол (Москва, Россия). Пробы с консервантом центрифугировали; ДНК из полученных осадков выделяли с помощью набора реагентов “Сорб-ГМО-Б” (Синтол, Россия), в соответствии с инструкцией производителя. Качество и концентрации выделенной ДНК определяли по флуоресценции набором для определения малых количеств двухцепочечной ДНК в растворе ds DNA на приборе Quantus, Promega (США). Для амплификации варибельного участка V4 гена 18S рРНК эукариот использовали праймеры Ek-NSF573 (5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCA-3') и Ek-NSR951 (5'-TTGGYRAATGCTTTCGC-3') (Mangot *et al.*, 2013) со стандартными адаптерами Illumina.

Индексирование ампликонов проводили с помощью набора реагентов Nextera XT Index Kit (Illumina), последующую очистку продуктов — на магнитных частицах AMPure XP Beads в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию полученной ДНК определяли, как указано выше для общей выделенной ДНК, образцы объединяли в эквимоллярных количествах. Парноконцевое секвенирование полученных библиотек ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina) с использованием набора реагентов MiSeq Reagent Kit v2, 500 циклов. Полученные последова-

Таблица 1. Характеристика станций отбора проб

№ станции	3	4	5	6	7	8
Координаты (с.ш., в.д.)	53.3749, 48.6466	53.2653, 48.9260	53.2752, 49.1160	53.3771, 49.2490	53.3969, 49.2834	53.3988, 49.1818
Участок	Река	Залив	Залив	Залив	Водохр.	Водохр.
Описание	Ниже с. Шигоны	У пос. Миронов	У г. Междуреченск	Район устья	Ниже устья залива	Выше устья залива
Глубина, м	1	3.3	6.5	15.1	17.9	17.4
Прозрачность, м	0.6	0.55	0.45	0.8	1.0	2.3
Концентрация O ₂ , мг/л	6.9	9.5	9.25	10	8.07	7.14
Электропроводность, µSm/cm	569	335	316	316	317	340
pH	8.09	9.22	8.31	9.2	9.84	8.4
Eh	200	158	154	155	131	175.3
Температура, °C	20.6	24.8	25.2	28.2	28.8	26.2

Примечание. Химические показатели приведены для поверхностного слоя.

тельности депонировали в NCBI Sequence Read Archive (биопроект PRJNA825541).

Биоинформатический анализ. Контроль качества полученных последовательностей Illumina был проведен с помощью программы FastQC (v. 0.11.7) (Wingett, Andrews, 2018). Для обработки полученных сырых данных использовали программу Usearch 11.0.67 (Edgar, 2013). Объединение парных последовательностей проводили, используя команду `-ufastq_mergepairs` с параметрами `-fastq_minovlen 20` и `-fastq_minmergelen 300`, т.е. ограничивали длину области перекрытия – не менее 20 нуклеотидов (нк) и длину объединенной последовательности – не менее 300 нк, поскольку при номинальной длине целевого фрагмента около 380 нк некоторые эукариоты (например, инфузории класса Litostomatea) имеют в данной области крупные делеции. Таким образом, выделялись объединенные последовательности длиной 300–480 нк. Из полученной объединенной библиотеки командой `-fastq_filter` с опцией `-maxee 1.0` были исключены последовательности с ожидаемым числом ошибок >1 , после чего командой `-fasx_unique` была проведена дерепликация. Полученные уникальные последовательности были кластеризованы на уровне 97% с помощью команды `-cluster_otus` со стандартными параметрами. В процессе кластеризации были удалены “de novo” химерные последовательности. Дополнительную фильтрацию химерных последовательностей с помощью “бесхимерных баз” не проводили.

Таксономическую принадлежность полученных операционных таксономических единиц (ОТЕ) определяли с помощью элайнера SINA v. 1.2.11 (Pruesse *et al.*, 2012) с использованием базы данных SILVA SSU v. 138.1 (Quast *et al.*, 2013) с порогом сходства 0.8 и базы данных PR2 v. 4.14.0.

Последняя классификация, после коррекции систематики в соответствии с последней сводкой Международного общества протистологов (Adl *et al.*, 2019) была принята за основу. Для уточнения таксономического положения ОТЕ в случае разночтений дополнительно использовали алгоритм BLAST на платформе NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Поскольку целью работы являлся анализ сообщества протистов, последовательности, принадлежащие Metazoa (составлявшие около половины всех полученных последовательностей) и небольшое число последовательностей высших растений были исключены из дальнейшего рассмотрения. Чтобы исключить дублирование, были отброшены также последовательности нуклеоморфных 18S рРНК криптофитов.

В качестве доминирующих ОТЕ были выделены те, которые хотя бы в одной пробе составляли не менее 3% последовательностей, принадлежащих протистам.

Статистический анализ. Другие вычисления, включая статистический анализ результатов и их графическое представление, были выполнены в программах MS Office 2019, Past (v.3.04) и в программной среде R с использованием библиотек Vegan, Caroline и др.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Район исследования и экологические условия в период отбора проб (табл. 1). Река Уса – правый приток р. Волги, впадает в Куйбышевское водохранилище, образуя Усинский залив, представляющий собой пресноводный эстуарий. В период исследования наибольший прогрев воды был зарегистрирован в устье залива и в Приплотинном плесе Куйбышевского водохранилища ниже впа-

Таблица 2. Альфа-разнообразие исследованных сообществ планктонных протистов в р. Уса, Усинском заливе и прилегающих участках Куйбышевского водохранилища

№ станции	3	4	5	6	7	8	Река	Залив	Водохр.	Всего
Район	Река	Зал.	Зал.	Зал.	Вод.	Вод.				
Всего, включая Metazoa и высшие растения										
Число последовательностей	104069	115533	104202	103034	105168	96366	104069	322769	201534	628372
Число ОТЕ	865	439	406	421	435	356	865	627	507	1261
Только протисты, включая истинные грибы										
Число последовательностей	80560	74508	80261	32210	22946	16515	80560	186979	39461	307000
Число ОТЕ	784	392	367	384	405	327	784	568	469	1150
Индексы (только протисты, включая истинные грибы):										
Chao1	793.6	422.0	393.7	421.0	465.3	370.1	793.6	598.1	509.0	1150
Шеннона (H, log ₂)	6.57	5.54	5.23	5.79	5.48	4.94	6.57	5.71	5.47	6.8
Выровненности Пилоу (E)	0.68	0.64	0.61	0.67	0.63	0.59	0.68	0.62	0.62	0.67
Доминирования Симпсона (S)	0.03	0.05	0.06	0.04	0.07	0.11	0.03	0.04	0.08	0.02
Доминирования Бергера-Паркера	0.123	0.111	0.166	0.128	0.217	0.304	0.123	0.112	0.254	0.08

дения р. Усы, а минимальный — на речной станции (табл. 1). Прозрачность воды по диску Секки изменялась в широких пределах, ее наименьшая величина была зарегистрирована в средней части Усинского залива, а наибольшая — в Приплотинном плесе, выше впадения р. Усы (табл. 1). Вода на всех станциях была хорошо аэрирована (табл. 1), до глубины трех прозрачностей насыщение воды растворенным кислородом составляло $101 \pm 14\%$, а глубже оно несколько снижалось ($87 \pm 12\%$). Содержание Хл *a* в интегральных пробах изменялось от 2.9 мкг/л (ст. 3) до 146.5 мкг/л (ст. 5). По данным микроскопического анализа, цианобактерии вносили основной вклад в численность (88–99.8%) и биомассу (36–98%) фитопланктона (Уманская и др., 2021), что позволяет рассматривать их в качестве экологического фактора для планктонных протистов.

Общая характеристика выделенных ОТЕ, альфа-разнообразие планктонных протистов. Полученная объединенная библиотека “сырых” последовательностей содержала 778889 парных чтений. В результате биоинформатического анализа из них было выделено 1261 ОТЕ, объединяющих 628372 последовательностей (табл. 2). После исключения ОТЕ, относящихся к Metazoa и высшим растениям, осталось 307000 последовательностей и 1150 ОТЕ, принадлежащих протистам, включая истинные грибы (Fungi). Количество последовательностей и число ОТЕ протистов заметно варьировало от станции к станции (табл. 2).

Наибольшее количество ОТЕ, максимально возможное видовое богатство и наименее выраженное доминирование (табл. 2) зарегистрировано на речной станции, а наименьшее разнообразие и максимально выраженное доминирование — на станции в водохранилище выше устья залива. В целом таксономическое разнообразие снижалось, а степень доминирования — возрастала в направлении от речного участка к водохранилищу (табл. 2).

Среди выделенных ОТЕ протистов только 93 ОТЕ (8.1%) были общими для всех шести проб, еще 305 ОТЕ (26.5%) были встречены не менее, чем в половине образцов (3–5 проб), а 752 ОТЕ были уникальными, т.е. встречались только в одной (586 ОТЕ; 51%) или двух пробах (166 ОТЕ; 14.4%). Наименьшее количество общих ОТЕ было обнаружено между рекой и водохранилищем. Интересно отметить, что среди уникальных ОТЕ 490 были обнаружены в пробе из речной станции, на остальных станциях их число было существенно меньше и составляло 13–37 ОТЕ.

Судя по индексу Chao1, октавному анализу (оценке ожидаемого полного числа ОТЕ в предположении о логнормальном распределении их численностей) и кривым разрежения (табл. 2, рис. 1), число ОТЕ, обнаруженных в объединенной библиотеке, близко к реально существующему, а в каждой из индивидуальных проб недоучтено от 1 до 15% их общего количества (от 10 до 43 ОТЕ). Однако, поскольку использованный алгоритм выделения операционных таксономических единиц

по умолчанию предполагает отбрасывание синглов, нельзя исключать, что реальное разнообразие планктонных протистов может быть еще выше.

Таксономический анализ сообщества простейших затрудняется тем, что их современная система (Adl *et al.*, 2019) является безранговой, поэтому трудно избежать смешения таксонов, находящихся на разных уровнях иерархии. В полученной нами библиотеке как по количеству последовательностей, так и по числу ОТЕ, преобладают Biconta (Diaphoretickes), преимущественно представители супергруппы SAR (рис. 2). Среди последних по числу ОТЕ преобладают Stramenopiles (в основном, Chrysophyceae (8.5%), Opalozoa (8.2%), Diatomea (4.7%) и Oomycetes (Peronosporomycetes) (3.7%)), но по количеству последовательностей — Alveolata (Ciliata (56.9%)) (рис. 2). Выраженное преобладание Ciliata по числу последовательностей вполне ожидаемо, поскольку инфузории имеют макронуклеусы с высокой степенью полиплоидизации и содержат в своих клетках как минимум на порядок больше копий гена 18S рРНК, чем любые другие простейшие, за исключением, возможно, многоядерных фораминифер (Gong *et al.*, 2013; Weber, Pawlowski, 2013). Rhizaria формируют 11.6% ОТЕ и 3.2% последовательностей и представлены в основном Cercozoa, около четверти ОТЕ принадлежит к неклассифицируемым. Поскольку амебофлагелляты в составе Rhizaria представляют собой один из основных таксонов пресноводных “гетеротрофных нанофлагеллят”, этот факт, безусловно, является поводом для дальнейшего исследования. Остальные представители Diaphoretickes (Archaeplastida, Cryptista и Haptista) составляют небольшую долю как по числу ОТЕ, так и по числу последовательностей (рис. 2).

Представители Amorphea составляют около трети обнаруженных ОТЕ, но довольно небольшую часть обнаруженных последовательностей (рис. 2), причем основной вклад среди них вносят Fungi.

Обнаружены лишь единичные последовательности, относящиеся к Discoba (3 ОТЕ и 13 последовательностей), хотя по данным микроскопического анализа (Уманская и др., 2021) в планктоне присутствовали, во всяком случае, фототрофные Euglenida (Euglenophyceae). Известно, что большинство праймеров к V4-участку 18S рРНК малоэффективны в отношении Excavata, в т. ч. Discoba, из-за большой длины этого участка (Geisen *et al.*, 2019). Мы обнаружили также, что использованный праймер Ek-NSR951 имеет низкое покрытие последовательностей 18S рРНК большинства Discoba. Таким образом, обилие Discoba действительно недоучитывается в полученной нами библиотеке.

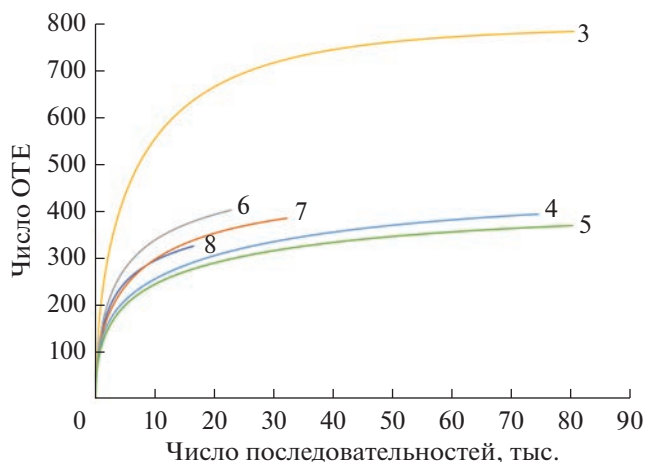


Рис. 1. Кривые разрежения последовательностей 18S рРНК, обнаруженных в исследованных пробах. Числами у кривых обозначены номера проб.

Только 4.3% ОТЕ не удалось классифицировать до типа, причем все они были минорными, составляя суммарно менее 0.4% всех последовательностей в библиотеке, и, таким образом, не оказывали значительного влияния на структуру планктонных протистов в экосистеме эстуарной зоны р. Уса.

В целом, подобный характер соотношения крупных таксонов довольно часто наблюдается в пресноводных речных и озерных экосистемах (Debroas *et al.*, 2017; Boenigk *et al.*, 2018; Cruaud *et al.*, 2019; David *et al.*, 2021; Singer *et al.*, 2021), а также в некоторых солоноватоводных эстуариях (Li *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020).

Трофическая специализация. В литературе выделяют многочисленные трофические стратегии, присущие протистам; так, гетеротрофные формы можно разделить на сапротрофов (типичный пример — истинные грибы), собирателей (амебы, большинство мелких жгутиконосцев); фильтраторов (хоанофлагелляты и др. сидячие формы, многие инфузории) и активно преследующих добычу рапторов (многие инфузории кл. Litostomatea и Prostomatea). Подавляющее большинство фототрофов способно питаться сапротрофно, а многие, кроме того, и фаготрофно (Saad *et al.*, 2013; Andersen *et al.*, 2015; Chakraborty *et al.*, 2017; Singer *et al.*, 2021). Реально многие виды протистов используют несколько трофических стратегий либо одновременно, либо на разных стадиях жизненного цикла.

Поэтому мы ограничились самой общей классификацией полученных ОТЕ по их преимущественной трофической стратегии, разделив их на фототрофные, гетеротрофные, в том числе паразитические, и “неопределенные”. Поскольку у Chrysophyceae и Dinoflagellata известна неодно-

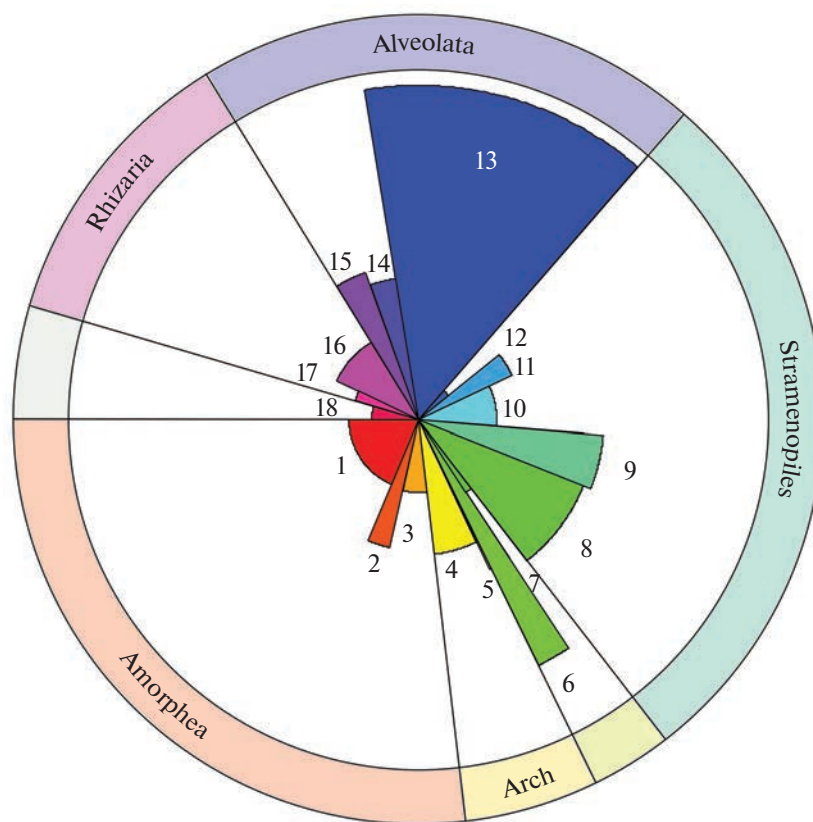


Рис. 2. Распределение числа последовательностей и ОТЕ протистов по таксономическим группам в объединенной библиотеке. Площадь сектора пропорциональна числу последовательностей, а угол отражает вклад в суммарное число ОТЕ в объединенной библиотеке. Обозначения таксонов: 1, Fungi; 2, Choanoflagellida; 3, прочие Amorphea; 4, Chlorophyta; 5, прочие Archaeplastida; 6, Cryptista; 7, Haptista (Centroplasthelida); 8, Chrysophyceae; 9, Diatomea; 10, Opalozoa; 11, Oomycetes; 12, прочие Stramenopiles; 13, Ciliophora; 14, Dinoflagellata; 15, прочие Alveolata; 16, Cercozoa; 17, прочие Rhizaria; 18, прочие и неопределенные.

кратная потеря фототрофии в части эволюционных ветвей и у отдельных видов, трофические стратегии ОТЕ, принадлежащих к этим группам, были определены по результатам построения филогенетических деревьев, причем ОТЕ, имеющие низкое сходство с известными последовательностями и не принадлежащие к эволюционным ветвям с определенной стратегией, были отнесены к “неопределенным”. К последним были отнесены также все ОТЕ, относящиеся к неклассифицированным эукариотам, неклассифицированным Stramenopiles и Alveolata.

Фототрофы, которые способны к фаготрофии, были выделены в группу миксотрофов, к которой отнесли всех фототрофных представителей Dinoflagellata, Cryptophyta, Dictyochophyceae и Chrysophyceae, исключая Synurales (табл. 3). Поскольку далеко не во всех случаях есть консенсус относительно отнесения ряда известных видов к миксотрофным или облигатно фототрофным (Charvet *et al.*, 2012; Stockner *et al.*, 2017; Dorrell *et al.*, 2019; Bock *et al.*, 2022; Suzuki *et al.*, 2022), то в настоящей работе доля миксотрофных протистов в планк-

тонном сообществе исследованного района оценена как потенциальная, без учета интенсивности фаготрофии конкретных видов в реальных условиях.

Приобретенная миксотрофия за счет фототрофных симбионтов или клептопластии известна у многих видов инфузорий; однако в полученной нами библиотеке ОТЕ, близкие к известным видам, содержащим зоохлореллы или клептопласты, отсутствовали.

В объединенной библиотеке среди планктонных протистов преобладали гетеротрофы (77.9% последовательностей), в том числе паразитические протисты – 3.0%. Фототрофы составляли 18.2% от общего числа последовательностей, включая 8.7% миксотрофных, а “неопределенные” – 3.9%. Доли фото-, миксо- и гетеротрофов, а также их таксономический состав, менялись от станции к станции (табл. 3). Интересно отметить, что среди миксотрофов на речной станции больший вклад вносили представители Chrysophyceae, тогда как в заливе и в водохранилищных станциях – Cryptophyta (табл. 3).

Таблица 3. Изменение таксономической и функциональной структуры сообществ планктонных протистов вдоль длинной оси Усинского залива (в % от общего числа последовательной в пробе)

Группа	станция 3 река	станция 4 залив	станция 5 залив	станция 6 устье залива	станция 7 водохранилище ниже устья	станция 8 водохранилище выше устья
Фототрофы	30.2 Diatomea (18.6) Chrysophyceae† (8.5) Chlorophyta (2.3) Cryptophyta† (0.7) Dinoflagellata† (0.2)	16.7 Cryptophyta† (9.0) Dinoflagellata† (3.8) Chlorophyta (3.1) Diatomea (0.6) Chrysophyceae† (0.2)	10.0 Cryptophyta† (4.5) Dinoflagellata† (2.7) Chlorophyta (2.4) Diatomea (0.2) Chrysophyceae† (0.2)	13.5 Chlorophyta (6.9) Dinoflagellata† (2.9) Cryptophyta† (1.6) Diatomea (1.1) Chrysophyceae† (0.9)	12.4 Chlorophyta (3.9) Cryptophyta† (3.2) Dinoflagellata† (2.6) Diatomea (2.2) Chrysophyceae† (0.5)	23.2 Diatomea (10.5) Chlorophyta (7.3) Cryptophyta† (3.8) Dinoflagellata† (1.0) Chrysophyceae† (0.6)
Гетеротрофы	57.1 Ciliates (30.1). в м.ч.: <i>Oligohymenophorea</i> (18.4) <i>Litostomatea</i> (4.5) <i>Phyllopharyngea</i> (2.7) <i>Spirotrichea</i> (2.1) <i>Prostomatea</i> (1.8) Chrysophyceae (10.7) Chytridiomycota* (3.9) Oomycetes (3.7) Cercospora (2) Dikarya (1.8) Choanoflagellata (0.9) Blastocladiomycota (0.7) Bicosoecida (0.5)	82.7 Ciliates (68.7). в м.ч.: <i>Spirotrichea</i> (39.0) <i>Oligohymenophorea</i> (20.6) <i>Litostomatea</i> (5.7) <i>Prostomatea</i> (1.7) <i>Colpodea</i> (1.4) Choanoflagellata (2.0) Kathablepharidae (1.9) Cercospora (1.1) Chytridiomycota* (0.9) Oomycetes (0.8) Chrysophyceae (0.8) Perkinsidae* (0.8) Bicosoecida (0.5) Centroplasthelida (0.5)	89.4 Ciliates (75.6). в м.ч.: <i>Spirotrichea</i> (37.8) <i>Oligohymenophorea</i> (29.2) <i>Litostomatea</i> (6.1) <i>Prostomatea</i> (1.6) <i>Colpodea</i> (1.0). Choanoflagellata (2.6) Cercospora (1.7) Chytridiomycota* (1.1) Tubulinea (1.0) Chrysophyceae (1.0) Kathablepharidae (0.9) Bicosoecida (0.9) MAST-12 (0.6) Vampyrellidae (0.5)	85.6 Ciliates (59.7). в м.ч.: <i>Spirotrichea</i> (25.8) <i>Oligohymenophorea</i> (22.6) <i>Litostomatea</i> (7.2) <i>Colpodea</i> (3.4) <i>Prostomatea</i> (0.7) Chrysophyceae (4.0) Cercospora (3.9) Chytridiomycota* (2.7) Kathablepharidae (2.7) MAST-12 (2.7) Choanoflagellata (1.5) Bicosoecida (1.1) Oomycetes (0.8) Perkinsidae* (0.7) Tubulinea (0.7)	85.9 Ciliates (53.0). в м.ч.: <i>Oligohymenophorea</i> (30.2) <i>Spirotrichea</i> (17.3) <i>Litostomatea</i> (4.1) <i>Colpodea</i> (0.8) <i>Prostomatea</i> (0.5) Cercospora (8.5) Chrysophyceae (3.0) Kathablepharidae (2.6) MAST-12 (2.3) Bicosoecida (2.1) Chytridiomycota* (2.1) Perkinsidae* (2.0) Choanoflagellata (1.2) Oomycetes (1.0) Tubulinea (0.5)	75.3 Ciliates (43.8). в м.ч.: <i>Oligohymenophorea</i> (34.1) <i>Spirotrichea</i> (6.7) <i>Litostomatea</i> (2.8) Cercospora (9.5) Perkinsidae* (5.2) Bicosoecida (3.8) Kathablepharidae (2.5) Choanoflagellata (1.9) Chytridiomycota* (1.3) Dikarya (1.1) Chrysophyceae (0.7) MAST-12 (0.5)
Неопределенные	12.7	0.6	0.6	0.9	1.7	1.5

Примечание. **Жирным** шрифтом выделены суммарные доли трофических групп, в скобках даны доли отдельных таксонов. * – паразитические группы, † – потенциально миксотрофные таксоны.

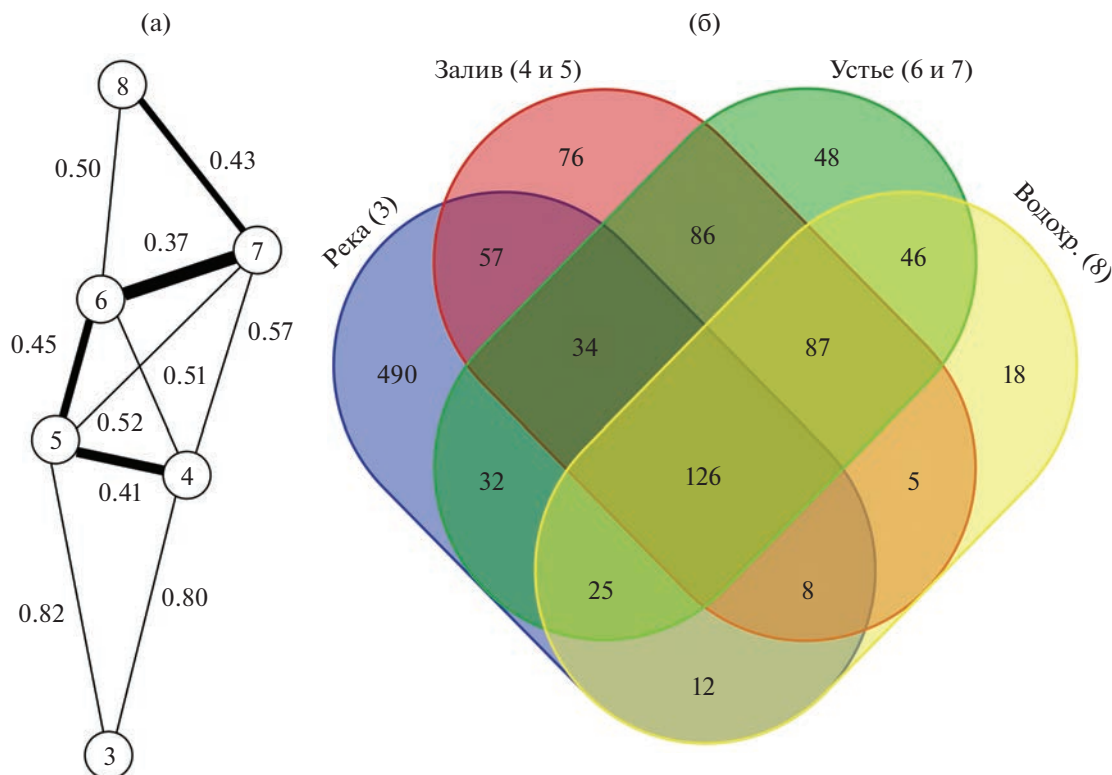


Рис. 3. (а) — граф различий между станциями по коэффициенту Жаккара. Жирными линиями показаны связи с расстоянием Жаккара менее 0.5. (б) — число общих и различных ОТЕ, обнаруженных на выделяемых с помощью кластерного анализа участках исследуемой акватории (диаграмма Венна).

Трансформация сообщества протистов в эстуарной системе р. Уса. Даже на уровне количества выделенных ОТЕ как оценки “видового богатства” очевидна линейная трансформация сообществ простейших вдоль длинной оси залива (табл. 2). Анализ изменения сообщества протистов с помощью качественного индекса Жаккара позволил объединить станции в несколько взаимосвязанных групп (рис. 3а). Станции 4–7 по своему составу образуют достаточно единую группу, однако различия по индексу Жаккара (1- J) между ними все же составляют не менее 37%. Особенно выделяется “речная” ст. 3, которая на этой диаграмме должна находиться не в плоскости всех остальных, а над ней, поскольку не показанные на схеме (рис. 3а) расстояния между ней и ст. 6–8 также составляют 81–85%. Наиболее близки по индексу Жаккара ст. 4 и 5 (41%), и, что довольно неожиданно, ст. 6 в устье залива и ст. 7 водохранилища ниже устья (37%). Мы предполагаем, что последнее связано с процессом водообмена между ними, обусловленным недельными и суточными колебаниями уровня водохранилища из-за работы Жигулевской ГЭС (Жариков, 2000), однако это предположение требует дополнительных подтверждений. При этом, траектория наименьших различий соответствует порядку станций вдоль оси

залива (рис. 3а). Таким образом, было выявлено четыре группы проб: речной участок (ст. 3), собственно залив (ст. 4 и 5), устьевой участок (ст. 6 и 7) и водохранилище вне влияния залива (ст. 8).

Выводы о закономерном изменении сообщества протистов вдоль длинной оси залива подтверждаются анализом уникальных и общих ОТЕ в этих четырех группах проб (диаграмма Венна, рис. 3б). Как видно из диаграммы, речной участок чрезвычайно сильно отличается от всех остальных. Более половины зарегистрированных в нем ОТЕ не встречены на остальных станциях, в то время как на остальных участках количество уникальных ОТЕ почти на порядок меньше.

Для количественной оценки β -разнообразия были рассчитаны коэффициенты различия Брея–Кёртиса и взвешенные UniFrac-расстояния (Lozupone, Knight, 2005) между исследованными пробами. Оба метода дали практически одинаковые результаты, выявив те же самые 4 группы сообществ (рис. 4а), которые выделяются и при кластерном анализе по качественному индексу Жаккара. Необходимо отметить, что концентрация Хл *a* и биомасса цианобактерий были максимальными на станциях собственно залива, а доля последовательностей Metazoa — на станциях устья залива и водохранилища (рис. 4б). В целом эти показате-

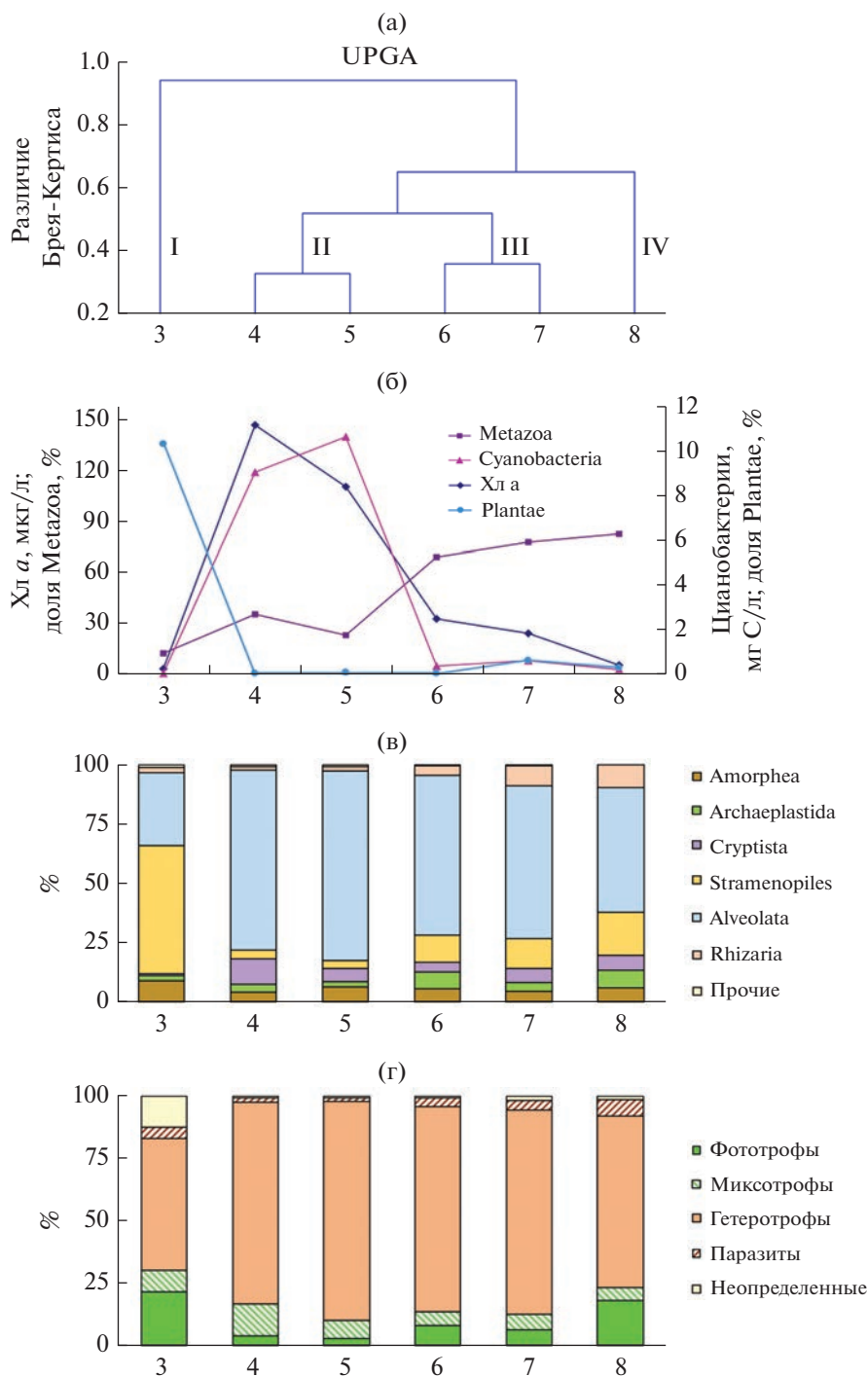


Рис. 4. Трансформация сообщества протистов в системе река—залив—водохранилище: (а) дендрограмма различия исследованных сообществ по индексу Брея-Кертиса методом невзвешенного среднего (UPGMA); (б) изменение экологических факторов, влияющих на сообщества протистов, в эстуарной системе; изменение таксономической (в) и функциональной (г) структуры сообществ протистов на разных станциях. По оси X здесь и на рис. 4 — номера станций (см. табл. 1). Номера кластеров указаны римскими цифрами.

ли, влияющие на сообщество протистов, закономерно меняются вдоль эстуарной системы, а их величины заметно различаются в разных кластерах (рис. 4а, 4б).

Сообщество протистов речного участка (I кластер) отличалось наибольшим числом ОТЕ и наибольшим разнообразием по индексу Шеннона, выровненности (индексу Пieloу) и индексу раз-

Таблица 4. Таксономическая принадлежность доминирующих ОТЕ (* – таксон указан с учетом поиска в базе данных Genbank) и доли (%) принадлежащих к ним последовательностей на исследованных станциях

ОТЕ	3	4	5	6	7	8	Таксономическая принадлежность
ОТЕ-3	0.025	11.1	10.5	12.8	11.9	4.70	Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia
ОТЕ-4	0.024	4.14	16.6	5.64	3.73	3.38	Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Epistylis*
ОТЕ-5	0.011	0.027	3.55	6.58	21.7	30.4	Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Vorticella
ОТЕ-6	0.006	10.9	4.79	0.031	0.022	0.200	Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia; Rimostrombidium
ОТЕ-7	0.009	3.71	8.63	3.48	1.94	0.061	Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia
ОТЕ-9	12.3	0.005	0.002	0.012	0.004	0.018	Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Epistylis*
ОТЕ-10	0.39	5.86	2.91	1.03	1.91	2.50	Cryptophyceae; Cryptomonadales; Cryptomonas
ОТЕ-13	0.009	7.38	4.57	7.74	3.57	0.061	Ciliata; Oligohymenophorea; Peritrichia; Vorticella
ОТЕ-14	0.011	2.78	2.85	3.25	1.97	0.309	Ciliata; Spirotrichea; Choreotrichia; Tintinnidium*
ОТЕ-15	0.53	4.79	4.86	1.12	0.296	0.206	Ciliata; Spirotrichea; Hypotrichia
ОТЕ-17	0.002	1.94	4.14	2.24	1.58	2.65	Ciliata; Litostomatea; Haptoria
ОТЕ-18	0.087	3.73	2.05	0.900	0.318	0.085	Ciliata; Oligohymenophorea
ОТЕ-21	6.20	0.015	0.025	0.258	0.558	0.085	Chrysophyceae
ОТЕ-22	5.84	0.020	0.001	0.016	0	0.006	Diatomea; Coscinodiscophytina; Melosirids; Melosira
ОТЕ-23	5.15	0.003	0.001	0.006	0.013	0.012	Chrysophyceae
ОТЕ-24	0.004	1.78	1.06	3.01	0.314	0.018	Ciliata; Spirotrichea
ОТЕ-34	0.037	2.28	1.92	3.24	0.989	1.01	Chlorophyta; Chlorophyceae; Chlamydomonadales; Phacotus
ОТЕ-37	1.14	0.221	0.078	0.351	1.28	9.70	Diatomea; Bacillariophytina; Mediophyceae; Stephanodiscus*
ОТЕ-47	4.58	0.008	0.001	0.040	0.057	0.006	Chrysophyceae
ОТЕ-49	0.005	0.148	0.096	1.02	3.09	0.012	Rhizaria; Cercozoa; Paracercomonadidae; Paracercomonas
ОТЕ-53	0.004	0.007	0	1.251	3.02	7.00	Rhizaria; Cercozoa; Thecofilosea; Cryomonadida
ОТЕ-60	0.001	0.076	0.052	0.472	1.43	3.65	Perkinsea; Perkinsidae
ОТЕ-414	0.002	0.464	0.238	2.21	3.64	1.30	Colpodellida

нообразия Симпсона, хотя индекс Бергера-Паркера (доля первого по рангу ОТЕ) и не был минимальным (табл. 2). Основной вклад, в порядке убывания числа последовательностей в этом кластере вносили Stramenopiles, Alveolata и Amorphea (рис. 4в). Среди Stramenopiles преобладали хризифиты (31% общего числа последовательностей) и диатомей (18.6%). Среди хризифитов наибольший вклад вносили ОТЕ с неясной трофической стратегией (11.9%), причем в их число входят и два доминирующих ОТЕ (ОТЕ-21 и ОТЕ-47), поскольку они принадлежат к группе, содержащей как миксотрофные, так и гетеротрофные виды, но одинаково далеки и от тех, и от других (табл. 3, 4, 5, рис. 5). К гетеротрофным принадлежали 10.6% ОТЕ Chrysophyceae, доля фототрофов (в подавляющем большинстве способных к миксотрофии) была еще ниже (8.5%). Почти треть последовательностей диатомей (5.8%) составляла единственная ОТЕ-22, идентичная по нуклеотидной последовательности *Melosira varians* (табл. 4, 5). Alveolata были представлены почти исключительно инфузориями, среди которых доминировали Oligohymenophorea (18.4%). Около 3/4 всех после-

довательностей Amorphea составляли истинные грибы (Fungi), причем наряду с Chytridiomycota в заметных количествах присутствовали преимущественно наземные Dicarya. Вороничковые жгутиконосцы, Choanoflagellata, были немногочисленны в сравнении с другими станциями (табл. 3, рис. 5).

В отличие от речного участка (I кластер), в остальных кластерах основной вклад в количество последовательностей вносили Alveolata (табл. 3, рис. 4, 5).

Сообщества станций собственно залива (кластер II) характеризовались наиболее сильным доминированием Alveolata, среди которых преобладали инфузории (рис. 4в, 5). В отличие от I кластера, доминирование в составе инфузорий перешло от Oligohymenophorea, среди которых доминировали сидячие эпифитные формы, к эупланктонным Spirotrichea. В составе фототрофных противост преобладали криптофитовые, динофитовые и, в меньшей степени, зеленые водоросли, а диатомовые были очень немногочисленны (табл. 3, рис. 5). Stramenopiles в целом были представлены небольшим числом последовательностей, но довольно разнообразны (рис. 5). В их составе преоб-

Таблица 5. Последовательности в базе данных Genbank, ближайшие к доминирующим ОТЕ

ОТЕ	Ближайший культивируемый вид, штамм		Ближайший изолят или некультивируемый клон		
	название	% сходства	№ в Genbank	название	№ в Genbank
Ciliata					
ОТЕ-3	<i>Strobilidium caudatum</i>	91.52	AY143573	<i>Rimostrombidium</i> sp. FU44-33	EU024986
ОТЕ-4	<i>Epistylis foissneri</i> WT2019052101	97.9	MW172838	<i>Epistylis</i> sp. 4 PS-2016	KU363236
ОТЕ-5	<i>Vorticella campanula</i> 17S1S2	100	JN120219		
ОТЕ-6	<i>Rimostrombidium lacustris</i> 10ZS18	100	LS999904		
ОТЕ-7	<i>Tintinnidium fluviatile</i> CBO42	100	JQ408163		
ОТЕ-9	<i>Epistylis vaginula</i> WT2018120601 <i>Epistylis foissneri</i> WT2019052101	98.2	MW172840 MW172838	eukaryote OD_euk_21	LC222866
ОТЕ-13	<i>Vorticella citrina</i> 80SmallVor	99.7	JN120226		
ОТЕ-14	<i>Strobilidium caudatum</i>	93.53	AY143573	clone AY2009E19	HQ219462
ОТЕ-15	<i>Urosoma salmastra</i> DJY2015111406	98.83	MH393884	clone 2-40	KM658533
ОТЕ-17	<i>Pseudoholophrya terricola</i>	96.36	KT246085	ciliate clone NPS05-106	DQ115954
ОТЕ-18	<i>Cinetochilum margaritaceum</i> CMFAC	90.77	MW405096	ciliate isolate 3ZS18	LR025746
ОТЕ-24	<i>Oxytricha elegans</i>	92.98	AM412767	ciliate clone C-24	KC851781
Cryptista					
ОТЕ-10	<i>Cryptomonas rostriformis</i> CPCC343 <i>Cryptomonas ovata</i> UTEX LB2783 <i>Cryptomonas tetraprenoidosa</i> CCAP979/26 <i>Cryptomonas lucens</i> CCAP979/35 <i>Cryptomonas curvata</i> CNUCRY 90	100	MK828441 MK828421 MK828416 MK828413 KF907377		

Таблица 5. Окончание

ОТЕ	Ближайший культивируемый вид, штамм		Ближайший изолят или некультивируемый клон	
	название	% сходства	№ в Genbank	название
Archaeplastida				
ОТЕ-34	<i>Phacotus lenticularis</i>	100	X91628	
Stramenopiles				
ОТЕ-21	<i>Urostipulosphaera notabilis</i> U12-1	94.22	MK153247	isolate P506
ОТЕ-23	<i>Chryso-sphaerella brevispina</i> S 74.D5	86.48	HF549059	freshwater eukaryote K7MAR2010
ОТЕ-47	<i>Urostipulosphaera notabilis</i> U12-1	94.22	MK153247	clone tf1-1-29
ОТЕ-22	<i>Melosira varians</i> CHMP7	100	AY569590	
ОТЕ-37	<i>Stephanodiscus</i> cf. <i>akanensis</i> TNS AL-56510 <i>Stephanodiscus hantzschii</i> UTCC 267 <i>Stephanodiscus minutulus</i> D03_012 <i>Stephanodiscus parvus</i> TCC355 <i>Cyclostephanos dubius</i> Waco5 <i>Peridiniopsis niei</i> Donghu	100	AB831893 GQ844874 FR873265 KT072953 HQ912575 JX141779	
Rhizaria				
ОТЕ-49	<i>Metabolomonas insania</i> HFCC 922	87.85	HM536167	isolate OTU494
ОТЕ-53	<i>Protaspis grandis</i>	93.24	DQ303924	clone KRL01E39
Protalveolata				
ОТЕ-60	<i>Peridinium umbonatum</i> FACHB 329	81.48	GU001637	Perkinsidae clone OTU71
ОТЕ-414	<i>Amphidinium herdmanni</i> CCCM 532	90.78	AF274253	clone KRL09E06

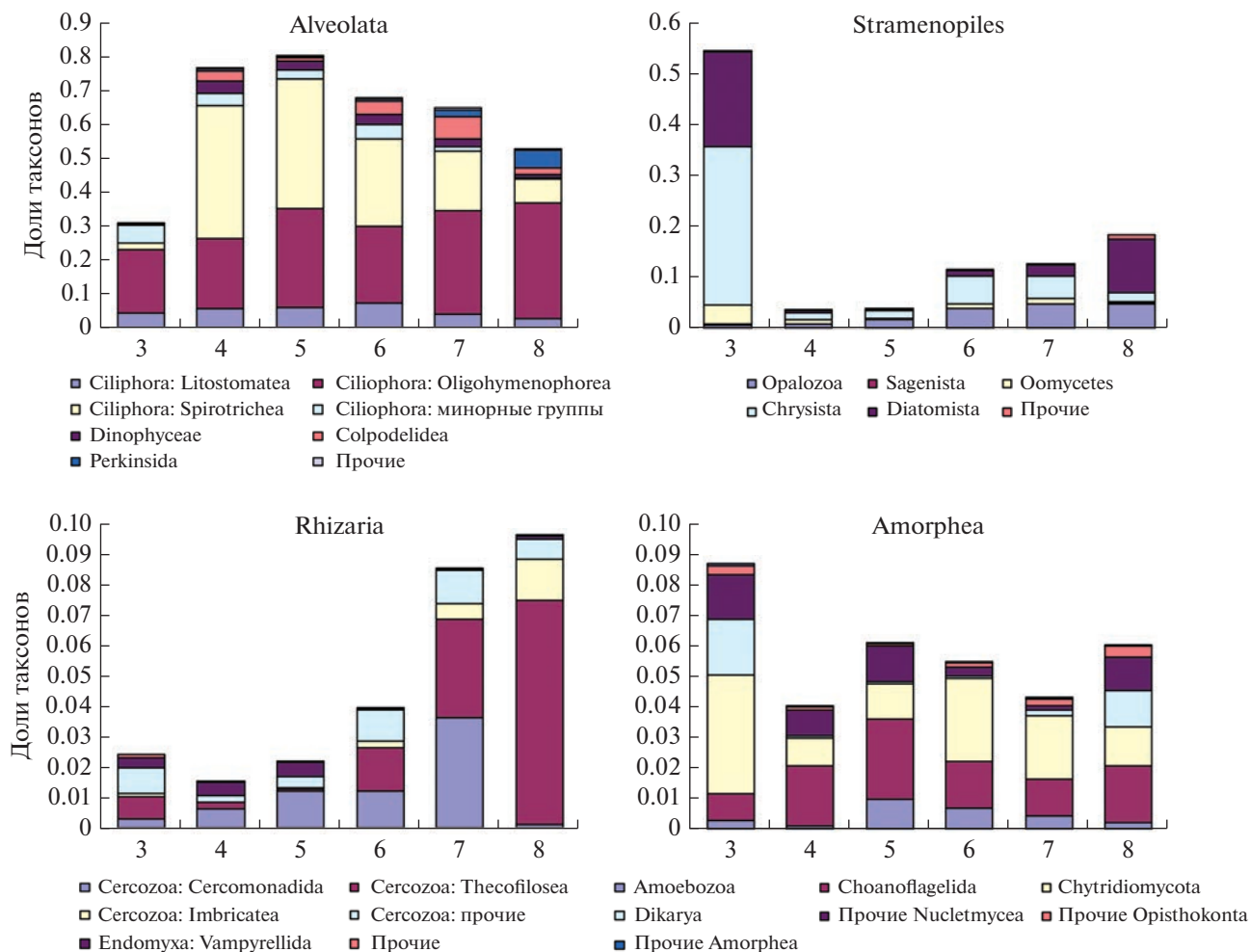


Рис. 5. Доли таксонов (от общего числа последовательностей), принадлежащих к доминирующим группам протистов на разных станциях исследованного района.

ладали гетеротрофы, причем наряду с хризифитовыми, заметную долю составляли жгутиконосцы Bicosoecida (Opalozoa) и оомицеты. Однако доминирующей группой среди гетеротрофных жгутиконосцев являлись Choanoflagellata (Amorphea: Opisthokonta). Относительно высоким также был вклад Katablepharida (Cryptista); на ст. 4 они были второй по числу последовательностей группой гетеротрофных жгутиконосцев (табл. 3, рис. 5).

В сообществах кластера III основной вклад, в порядке убывания числа последовательностей вносили Alveolata, Stramenopiles, Rhizaria и Archaeplastida (рис. 4в). Устьевой участок залива (ст. 6) заметно отличался от станций собственно залива (ст. 4 и 5) и был близок по составу протистов к ст. 7, расположенной в водохранилище ниже устья залива (рис. 4, 5). В этом кластере среди инфузорий так же, как в заливе преобладали Oligohymenophorea и Spirotrichea, однако их соотношение несколько изменилось. Для этих двух станций характерна большая, по сравнению с заливом, доля Rhizaria и

Stramenopiles. Кроме того, здесь увеличены доли Chlorophyta, Colpodelleida и Chrysista, а среди Rhizaria преобладали Cercomonadidae и Thecofilosea (рис. 4в, 5, табл. 3).

Надо отметить, что в кластере II, с наибольшим развитием цианобактерий, доля миксотрофов примерно в 3 раза превышала долю “чистых” фототрофов, тогда как в кластере III их вклады были сопоставимы (табл. 3, рис. 4б, 4г).

Течения в прилегающей к заливу части водохранилища направлены в сторону гидроузла, от ст. 8 к ст. 7, а преобладающие ветра способствуют ветровому транспорту из залива в водохранилище, поэтому ст. 8 оказывается наиболее изолированной от залива. Состав протистов этой станции (IV кластер) вполне ожидаемо сильно отличался от остальных кластеров (табл. 3, рис. 4, 5). Среди супергруппы SAR здесь преобладали инфузории (преимущественно Oligohymenophorea). Как и в кластере I, доля фототрофных протистов была повышена (рис. 4г), и среди них преобладали ди-

атомеи; однако состав доминирующих ОТЕ существенно отличался от речного участка (табл. 3, 4 и 5). В целом, в кластере IV состав Stramenopiles был значительно более, а Rhizaria — менее разнообразен, чем на речной станции (рис. 5). В то же время, по обилию последовательностей Plantae (рис. 4б) и наземных Disarya (рис. 4в, 5), она сравнима с речной станцией, что, видимо, свидетельствует о существенном влиянии на нее наземной части водосбора, вероятно, из-за вышележащего строительства автомобильного моста через Климовскую узость водохранилища. Возможно, именно это антропогенное воздействие приводит к определенному сближению состава протистов станций кластеров I и IV на уровне высших таксонов, однако на уровне видов (ОТЕ) это сближение отсутствует (табл. 4).

Исследованная нами эстуарная система несет отдельные черты как экоклина, так и экотона (Atrill, Rundle, 2002). Безусловно, наиболее выраженные, и при этом разнонаправленные, для разных групп протистов изменения происходят при переходе от речного, лотического, участка к лентическим. На лентических станциях доли таких групп, как Rhizaria, инфузории кл. Oligohymenophorea и Litostomatea, а также Protalveolata относительно монотонно изменялись вдоль длинной оси залива по направлению к водохранилищу (рис. 4в, 5). Так, например, вклад Rhizaria закономерно увеличивался от ст. 4 к ст. 8.

Однако другие группы достигают выраженных локальных максимумов или минимумов в средней части залива: Stramenopiles и ряд принадлежащих к ним таксонов — минимума, а Choanoflagellata и инфузории кл. Spirotrichea, наоборот, максимума (рис. 4в, 5), что более характерно для экотона. Очень отличается от монотонного и изменение отдельных таксонов Rhizaria (рис. 5).

Все наши данные свидетельствуют о том, что залив в целом и станция водохранилища ниже устья залива образуют относительно связную систему, причем конечные точки — река (ст. 3) и участок водохранилища выше устья (ст. 8) — наиболее контрастны по составу протистов. Станции кластеров II и III довольно близки между собой, что указывает на существенную связь устьевой части залива с водохранилищем. Причиной этого, вероятно, является гидрологическая взаимосвязь между заливом и водохранилищем из-за циркуляционных течений, ветровых нагонов и течений, вызванных работой ГЭС.

Влияние экологических факторов на планктонных протистов эстуарной зоны р. Уса. Судя по результатам канонического корреляционного анализа, развитие Archaeplastida, Rhizaria и минорных групп протистов положительно коррелировало с долей Metazoa в общем составе эукариот, которое может рассматриваться как грубый показатель интенсив-

ности выедания (рис. 6). Развитие Stramenopiles и Amorphaea было положительно связано с долей последовательностей высших растений, вероятно, служащей индикатором влияния водосборной территории, поскольку, судя по отсутствию хлоропластных последовательностей в полученной параллельно библиотеке 16S РНК (не показ.), они были представлены в наших пробах только морт-массой и пылью. Остальные крупные группы, Haptista, Cryptista и Alveolata, были отрицательно связаны как с выеданием, так и с влиянием водосбора, и слабо положительно связаны с интенсивностью цветения цианобактерий (рис. 6). Основное влияние на развитие фототрофного компонента эукариотического планктона оказывают конкурентные взаимоотношения с цианобактериями; развитие последних приводит не только к подавлению развития эукариотических водорослей, но и к изменению их структуры, в том числе к увеличению доли миксотрофных видов. “Цветение” цианобактерий оказывает влияние и на структуру гетеротрофной части сообщества, хотя это влияние выражено менее ярко.

Доминирующие ОТЕ, интересные и неожиданные находки. Всего было выделено 23 доминирующих ОТЕ (табл. 4, 5). Из них более половины, 12 ОТЕ, принадлежали Ciliata; остальные относились к Chrysophyta (3 ОТЕ), Diatomea, Rhizaria и Protalveolata (по 2 ОТЕ), Chlorophyta и Cryptophyceae (по 1 ОТЕ). За исключением ОТЕ-18 и ОТЕ-24, представители Ciliata, Chlorophyta и Cryptophyceae уверенно классифицируются по крайней мере до рода (сходство с изолятами валидных видов >95–96%). Проблему составляет скорее низкое разрешение для баркодинга выбранного участка 18S рРНК. Так, в случае ОТЕ-9, ОТЕ-10 и ОТЕ-37 идентичные последовательности, совпадающие или очень близкие к обнаруженным в наших пробах имели изоляты сразу нескольких разных видов (табл. 5). В то же время, доминирующие ОТЕ Chrysophyta, Rhizaria и Protalveolata имели низкое сходство с последовательностями валидно описанных видов, и, следовательно, относились к новым и неописанным таксонам.

Наряду с доминирующими видами, большой интерес представляют и малочисленные, в т.ч. единичные, находки.

Две из обнаруженных в библиотеке ОТЕ (ОТЕ-754 и ОТЕ-1077) принадлежат к классу Volidophyceae (=Parmales). Эта группа, сестринская по отношению к диатомовым, до последнего времени считалась исключительно морской (Kuwata *et al.*, 2018), хотя с начала 21 века ее представители были зарегистрированы в нескольких пресных озерах (Richards *et al.*, 2005). После недавнего обнаружения Volidophyceae в оз. Байкал было выдвинуто предположение об их медленном проникновении из морских местообитаний в длительно существу-

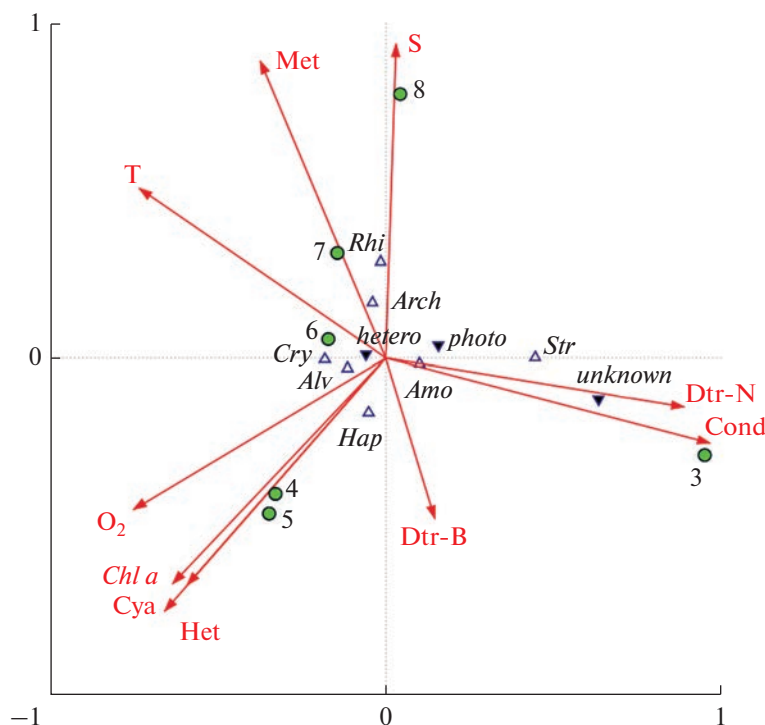


Рис. 6. Результаты канонического корреляционного анализа основных биотических и абиотических факторов и таксономического склад сообщества протистов на исследованных станциях Усинского залива и прилегающего участка Куйбышевского водохранилища. Факторы: Met – Metazoa, S – прозрачность, T – температура, O₂ – концентрация растворенного кислорода, Chl a – концентрация хлорофилла a, Cya – биомасса цианобактерий, Het – биомасса гетеротрофных бактерий, Dtr-B – масса детритных частиц, Dtr-N – количество детритных частиц, Cond – электропроводность. Трофическая специализация протистов: Hetero – гетеротрофные, Photo – фототрофные, Unknown – “неопределенные”. Макротаксоны: Amo – Amorphea, Arch – Archaeplastida, Str – Stramenopiles, Alv – Alveolata, Rhi – Rhizaria, Cry – Cryptista, Nap – Haptista, Oth – прочие. Станции: 3–8.

ющие “реликтовые” водоемы (Annenkova *et al.*, 2020). Однако наше обнаружение представителей Bolidophyceae в Куйбышевском водохранилище показывает, что распространение этой группы в пресных водоемах вовсе не требует длительного стабильного существования водных экосистем, а вероятно, вообще несколько более широко, чем представлялось.

В качестве других интересных находок можно отметить обнаружение в составе Archaeplastida ОТЕ-626, принадлежащей к недавно обнаруженной гетеротрофной группе Rhodelphida (Gawryluk *et al.*, 2019). Ее сходство с *Rhodelphis limneticus* Colp-38 (MK966713) составляет 94.2%. В составе Rhizaria присутствует ОТЕ-642, вероятно принадлежащая к р. *Paulinella* (сходство с последовательностью KX927958 *Paulinella micropora* KR04 – 94.4%). Возможно, этот организм содержит цианеллы и является фототрофом, поскольку последовательности, сходные с цианеллами близкого вида, *Paulinella chromatophora*, присутствуют в библиотеке прокариотических последовательностей исследованных станций, анализ которой будет опубликован позднее. Обе ОТЕ представлены небольшим количеством последовательностей и встречены только

на речной станции; они, вероятно, относятся к новым видам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным метабаркодинга 18S рРНК, в составе сообщества протистов эстуарного участка р. Усы и близлежащего участка Куйбышевского водохранилища обнаружено 1150 ОТЕ, среди которых преобладают представители SAR-супергруппы, Stramenopiles на речном участке и Alveolata – на остальных станциях. Все доминирующие по числу последовательностей ОТЕ принадлежат к группе Diaphoretikes, причем более половины из них составляют инфузории. Среди полученных последовательностей обнаружены принадлежащие к редким для пресных вод таксонам, в частности, Bolidophyceae (фототрофные строменилы, родственные диатомовым) и Rhodelphida (гетеротрофная группа, сестринская по отношению к Rhodophyta). Эти интересные находки расширяют биогеографию этих групп, которые в пресных водах обнаружены в очень небольшой части водоемов, и в основном молекулярно-генетическими методами.

Наблюдается очевидная трансформация сообществ простейших вдоль длинной оси исследованного района от речного участка до собственно водохранилища. Наиболее выражена она при переходе от речных к озерным условиям; однако прослеживается и в пределах лентического участка. Всего можно выделить 4 взаимосвязанных сообщества протистов: речного участка, собственно залива, устьевой зоны и водохранилища вне влияния залива. Наиболее контрастными по составу являются сообщества речного участка и участка водохранилища выше устья. В целом, исследованная нами эстуарная система несет черты как экотона, так и экотона. Основное влияние на развитие фототрофного компонента эукариотического планктона оказывают конкурентные взаимоотношения с цианобактериями; развитие последних приводит не только к подавлению развития эукариотических водорослей, но и к изменению структуры их сообщества. “Цветение” цианобактерий оказывает влияние и на структуру гетеротрофной части сообщества, хотя это влияние проявляется менее ярко.

Представленные нами данные могут служить отправной точкой для сравнения исследованного района с другими участками водохранилищ Волжско-Камского каскада и в целом с водоемами бассейна Волги.

Работа выполнена в рамках Государственного Задания по теме “Изменение, устойчивость и сохранение биологического разнообразия под воздействием глобальных изменений климата и интенсивной антропогенной нагрузки на экосистемы Волжского бассейна” (тема № 122032500063-0) и при частичной финансовой поддержке Губернского гранта в области науки и техники, утвержденного распоряжением Губернатора Самарской области от 30.06.2021 № 202-р. (грант № 38).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Андреева В.А., Быкова С.В., Уманская М.В., Тарасова Н.Г. Свободноживущие инфузории Усинского залива (Куйбышевское водохранилище) в разгар цианобактериального “цветения” // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2021. Т. 23. № 5(103). С. 127–134.
- Быкова С.В. Структура и пространственное распределение инфузорий в планктоне водохранилищ Средней и Нижней Волги // Биология внутренних вод. 2021. № 4. С. 353–366.
- Горохова О.Г., Зинченко Т.Д. Фитопланктон равнинной р. Уса и ее притоков (бассейн Куйбышевского водохранилища) // Поволжский экологический журн. 2018. № 4. С. 391–403.
- Жариков В.В. Специфика водохранилищ Волги как среды обитания гидробионтов (на примере свободноживущих инфузорий) // Теоретические проблемы экологии и эволюции (3-и Люблинские чтения). Тольятти: ИЭВБ РАН, 2000. С. 64–72.
- Корнева Л.Г. Фитопланктон водохранилищ бассейна Волги. Кострома: Костромской печатный дом, 2015. 284 с.
- Косолапов Д.Б., Копылов А.И., Косолапова Н.Г. Гетеротрофные жгутиконосцы в водной толще и донных отложениях Рыбинского водохранилища: видовой состав, численность, биомасса, роль в потреблении бактерий // Биология внутренних вод. 2017. № 2. С. 76–87.
- Косолапов Д.Б., Копылов А.И., Мильникова З.М., Косолапова Н.Г. Структура микробного планктонного сообщества Шекснинского водохранилища // Тр. ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН. 2016. № 74(77). С. 5–20.
- Ротарь Ю.М. Планктонные инфузории Куйбышевского водохранилища: Дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1995.
- Тарасова Н.Г., Уманская М.В. Видовой состав и эколого-географическая характеристика альгофлоры планктона реки Уса (Самарская область) // Фиторазнообразие Восточной Европы. 2021. Т. 15. № 4. С. 115–135.
- Тихоненков Д.В., Загуменный Д.Г., Беляев А.О., Плотников А.О., Герасимов Ю.В. Метабаркодинговые исследования протистов реки Волги / Биология водных экосистем в XXI в.: факты, гипотезы, тенденции: Тезисы докладов Всерос. конф. Ярославль: Филигрань, 2021. С. 181.
- Уманская М.В., Быкова С.В., Горбунов М.Ю., Краснова Е.С., Тарасова Н.Г. Трансформация одноклеточного планктона в системе река–залив–равнинное водохранилище в начальной фазе цианобактериального цветения // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2021. Т. 23. № 5(103). С. 144–151.
- Фитопланктон Нижней Волги: водохранилища и низовье реки. СПб.: Наука, 2006. 229 с.
- Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukeš J., Schoch C.L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M.W., Burki F., Cardenas P., Cepicka I., Chistyakova L., del Campo J., Dunthorn M., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A.A., Hoppenrath M., James T.Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D.J.G., Lara E., Gall L. Le, Lynn D.H., Mann D.G., Massana R., Mitchell E.A.D., Morrow C., Park J.S., Pawlowski J.W., Powell M.J., Richter D.J., Rueckert S., Shadwick L., Shitano S., Spiegel F.W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes // J. Eukaryot. Microbiol. 2019. V. 66. № 1. P. 4–119.
- Andersen K.H., Aksnes D.L., Berge T., Fiksen Ø., Visser A. Modelling emergent trophic strategies in plankton // J. Plankton Res. 2015. V. 37. № 5. P. 862–868.
- Annenkova N.V., Giner C.R., Logares R. Tracing the origin of planktonic protists in an ancient lake // Microorganisms. 2020 V.8. № 4. P. 543.
- Attrill M.J., Rundle S.D. Ecotone or ecocline: ecological boundaries in estuaries // Estuar. Coast. Shelf Sci. 2002. V. 55. № 6. P. 929–936.
- Bock C., Olefeld J.L., Vogt J.C., Albach D.C., Boenigk J. Phylogenetic and functional diversity of Chrysophyceae in

- inland waters // *Organisms Diversity & Evolution*. 2022. V. 22. № 2. P. 327–341.
- Boenigk J., Wodniok S., Bock C., Beisser D., Hempe C., Grossmann L., Lange A., Jensen M. Geographic distance and mountain ranges structure freshwater protist communities on a European scale // *Metabarcoding and Metagenomics*. 2018. № 2. P. e21519.
- Chakraborty S., Nielsen L.T., Andersen K.H. Trophic strategies of unicellular plankton // *Am. Nat.* 2017. V. 189. № 4. P. E77–E90.
- Charvet S., Vincent W.F., Lovejoy C. Chrysophytes and other protists in High Arctic lakes: molecular gene surveys, pigment signatures and microscopy // *Polar Biol.* 2012. V. 35. P. 733–748.
- Cruaud P., Vigneron A., Fradette M.S., Dorea C.C., Culley A.I., Rodriguez M.J., Charette S.J. Annual protist community dynamics in a freshwater ecosystem undergoing contrasted climatic conditions: The Saint-Charles River (Canada) // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 2359.
- David G.M., Moreira D., Reboul G., Annenkova N.V., Galindo L.J., Bertolino P., López-Archilla A.I., Jardillier L., López-García P. Environmental drivers of plankton protist communities along latitudinal and vertical gradients in the oldest and deepest freshwater lake // *Env. Microbiol.* 2021. V. 23. № 3. P. 1436–1451.
- Debroas D., Domaizon I., Humbert J. F., Jardillier L., Lepère C., Oudart A., Taib N. Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2017. V. 93. № 4. P. fix023.
- Dorrell R.G., Azuma T., Nomura M., de Kerdrel G.A., Paoli L., Yang S., Bowler C., Ishii K.-I., Miyashita H., Gillian H., Gile G.H., Kamikawa R. Principles of plastid reductive evolution illuminated by nonphotosynthetic chrysophytes // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2019. V. 116. № 14. P. 6914–6923.
- Edgar R. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 10. P. 996–998.
- Fujimoto M., Cavaletto J., Liebig J.R., McCarthy A., Vanderploeg H.A., Denef V.J. Spatiotemporal distribution of bacterioplankton functional groups along a freshwater estuary to pelagic gradient in Lake Michigan // *J. Great Lakes Res.* 2016. V. 42. № 5. P. 1036–1048.
- Gawryluk R.M., Tikhonenkov D.V., Hehenberger E., Husnik F., Mylnikov A.P., Keeling P.J. Non-photosynthetic predators are sister to red algae // *Nature*. 2019. V. 572. № 7768. P. 240–243.
- Geisen S., Vaulot D., Mahé F., Lara E., de Vargas C., Bass D. A user guide to environmental protistology: primers, metabarcoding, sequencing, and analyses // *BioRxiv*. 2019. P. 850610.
- Gong J., Dong J., Liu X., Massana R. Extremely high copy numbers and polymorphisms of the rDNA operon estimated from single cell analysis of oligotrich and peritrich ciliates // *Protist*. 2013. V. 164. № 3. P. 369–379.
- Herdendorf C.E. Great lakes estuaries // *Estuaries*. 1990. V. 13. № 4. P. 493–503.
- Kuwata A., Yamada K., Ichinomiya M., Yoshikawa S., Tragin M., Vaulot D., Lopes dos Santos A. Bolidophyceae, a sister picoplanktonic group of diatoms – a review // *Front. Mar. Sci.* 2018. V. 5. P. 370.
- Li R., Jiao N., Warren A., Xu D. Changes in community structure of active protistan assemblages from the lower Pearl River to coastal Waters of the South China Sea // *Eur. J. Protistol.* 2018. V. 63. P. 72–82.
- Likens G.E. (Ed.) *Plankton of inland waters*. Academic Press, 2010. 412 p.
- Loken L.C., Small G.E., Finlay J.C., Sterner R.W., Stanley E.H. Nitrogen cycling in a freshwater estuary // *Biogeochemistry*. 2016. V. 127. № 2. P. 199–216.
- Lozupone C., Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities // *Applied and environmental microbiology*. 2005. V. 71. № 12. P. 8228–8235.
- Mangot J.F., Domaizon I., Taib N., Marouni N., Duffaud E., Bronner G., Debroas D. Short-term dynamics of diversity patterns: evidence of continual reassembly within lacustrine small eukaryotes // *Environ. Microbiol.* 2013. V. 15. № 6. P. 1745–1758.
- Nowak B.M., Ptak M. The effect of a water dam on Lake Powidzkie and its vicinity // *Bull. Geogr. Phys. Geogr. Ser.* 2018. V. 15. № 1. P. 5–13.
- Obodovskiy O., Habel M., Szatten D., Rozlach Z., Babiński Z., Maerker M. Assessment of the Dnieper Alluvial Riverbed stability affected by intervention discharge downstream of Kaniv Dam // *Water*. 2020. V. 12. № 4. P. 1104.
- Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 1823–1829.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41(D1). P. D590–D596.
- Richards T.A., Vepritskiy A.A., Gouliamova D.E., Nierzwiczki-Bauer S.A. The molecular diversity of freshwater picoeukaryotes from an oligotrophic lake reveals diverse, distinctive and globally dispersed lineages // *Environ. Microbiol.* 2005. V. 7. № 9. P. 1413–1425.
- Saad J.F., Schiaffino M.R., Vinocur A., O'Farrell I., Tell G., Izaguirre I. Microbial planktonic communities of freshwater environments from Tierra del Fuego: dominant trophic strategies in lakes with contrasting features. // *J. Plankton Res.* 2013. V. 35. № 6. P. 1220–1233.
- Singer D., Seppey C. V., Lentendu G., Dunthorn M., Bass D., Belbahri L., Blandenier Q., Debroas D., Arjen de Groot G.A., de Vargas C., Domaizon I., Duckert C., Izaguirre I., Koenig I., Mataloni G., Schiaffino M.R., Mitchell E.A.D., Geisen S., Lara, E. Protist taxonomic and functional diversity in soil, freshwater and marine ecosystems // *Environ. Int.* 2021. V. 146. P. 106262.
- Stoecker D.K., Hansen P.J., Caron D.A., Mitra A. Mixotrophy in the marine plankton // *Ann. Rev. Marine Sci.* 2017. V. 9. P. 311–335.
- Suzuki S., Matsuzaki R., Yamaguchi H., Kawachi M. What happened before losses of photosynthesis in cryptophyte algae? // *Molecular biology and evolution*. 2022. V. 39. № 2. P. msac001.
- Telesh I.V., Khlebovich V.V. Principal processes within the estuarine salinity gradient: a review // *Mar. Pollut. Bull.* 2010. V. 61. № 4–6. P. 149–155.

- Wang J., Fu Z., Qiao H., Liu F. Assessment of eutrophication and water quality in the estuarine area of Lake Wuli, Lake Taihu, China // *Sci. Total Environ.* 2019. V. 650. P. 1392–1402.
- Weber A.A., Pawlowski J. Can abundance of protists be inferred from sequence data: a case study of Foraminifera // *PloS one.* 2013 V. 8. № 2. P. e56739.
- Wingett S.W., Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control // *F1000Research.* 2018. V. 7. P. 1338.
- Xu H., Zhang S., Ma G., Zhang Y., Li Y., Pei H. 18S rRNA gene sequencing reveals significant influence of anthropogenic effects on microeukaryote diversity and composition along a river-to-estuary gradient ecosystem // *Sci. Total Environ.* 2020. V. 705. P. 135910.
- Zhao F., Filker S., Xu K., Huang P., Zheng S. Microeukaryote communities exhibit phyla-specific distance-decay patterns and an intimate link between seawater and sediment habitats in the Western Pacific Ocean // *Deep-Sea Res. I: Oceanogr. Res. Pap.* 2020. V. 160. P. 103279.

Diversity and Transformation of the Freshwater Planktonic Protist Community Along the Estuarine Tributary Zone of the Large Plainland Reservoir: 18S RRNA Gene Metabarkoding

M. V. Umanskaya^{1, #}, M. Yu. Gorbunov¹, S. V. Bykova¹, and N. G. Tarasova¹

¹ Samara Federal Research Scientific Center RAS, Institute of Ecology of Volga River Basin RAS, 10, Komzin str., Togliatti, 445003 Russia

[#]e-mail: mvumansk67@gmail.com

The first data on the composition and diversity of summer planktonic protist community in the Usinsky Bay and the adjacent water area of the Kuibyshev Reservoir, obtained using high-throughput sequencing of the 18S ribosomal RNA gene, are presented. In the structure of the protist community, 1150 OTUs were found, among which representatives of the SAR supertaxon (Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria) predominate. In the jointed library, OTUs are dominated by Stramenopiles, represented, in descending order, by Chrysophyceae (8.5%), Opalozoa (8.3%), Diatomea (4.7%), and Oomycetes (Peronosporomycetes) (3.7%), and by the number of sequences, by Alveolata (62.0%) and, first of all, Ciliata (56.9%). Four interconnected communities of protists were distinguished: the river section, the bay itself, the mouth zone, and the reservoir outside the influence of the bay (above the mouth). The most contrasting were the communities of the river area and the area of the reservoir above the mouth. In general, the studied estuarine system has the features of both an ecocline and an ecotone. The development of the phototrophic component of eukaryotic plankton is mainly influenced by competitive relationships with cyanobacteria. Cyanobacterial “bloom” also affects the structure of the heterotrophic part of the community, although this effect is less pronounced. The development of Archaeplastida, Rhizaria, and minor groups of protists positively correlates with the proportion of Metazoa sequences in samples, which reflects the intensity of metazooplankton pressure. Some of the obtained sequences belong to taxa rarely found in freshwater, such as Bolidophyceae and Rhodelphida. These finds expand the biogeography of these groups, which have so far been found in very few freshwater reservoirs.

Keywords: protists, plankton, high-throughput sequencing, taxonomic composition, spatial distribution, Kuibyshev reservoir, Usa River