

На правах рукописи

Галач

**ГАЛАЧЬЯНЦ
Агния Дмитриевна**

**ПОВЕРХНОСТНЫЙ МИКРОСЛОЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ:
ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, ЧИСЛЕННОСТЬ И АКТИВНОСТЬ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ**

03.02.08 –Экология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2017

Работа выполнена в лаборатории водной микробиологии в ФГБУН
«Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук»,
г. Иркутск

Научный руководитель:

Дрюккер Валентин Валерьянович, Заслуженный работник науки и высшей школы, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории водной микробиологии ФГБУН «Лимнологический институт СО РАН», г. Иркутск

Официальные оппоненты:

Бузолева Любовь Степановна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией экологии патогенных бактерий ФГБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова»; профессор кафедры морского биоразнообразия и морских биоресурсов Школы естественных наук ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток.

Маркова Юлия Александровна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий ФГБУН «Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН», г. Иркутск

Ведущая организация:

ФГБУН «Институт водных и экологических проблем ДВО РАН», г. Хабаровск

Защита диссертации состоится 22 декабря в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ИГУ» им. В.Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124, и на сайте Иркутского государственного университета:

<http://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=119>

Отзыв просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел./факс: (3952)24-18-55; e-mail: dissovet07@gmail.com

Автореферат разослан « ____ » октября 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А.А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Водный поверхностный микрослой (ПМС) является физической границей между гидросферой и атмосферой. ПМС характеризуется незначительной толщиной, не превышающей нескольких десятков микрометров, тем не менее, он резко отличается от водной толщи по физико-химическим характеристикам и содержит большое количество органических соединений, таких как липиды, белки и полисахариды (Гладышев, 1993; Лапшин, 2004; Zhang et al., 1998, 2003). Поверхностный микрослой занимает около 70% земной поверхности, покрывая все без исключения водоемы, как морские, так и пресные. В связи с особенностями расположения ПМС подвержен сильному влиянию климатических и погодных явлений таких, как солнечная радиация, ветер, осадки, изменения температуры и т.п.; здесь в высоких концентрациях присутствуют вещества, переносимые аэрозолями, в том числе различные поллютанты (Cunliffe et al., 2011). ПМС, располагаясь на границе раздела фаз вода–воздух и обладая уникальными физико-химическими характеристиками, образует особую среду для обитания гидробионтов и обуславливает формирование специфического сообщества микроорганизмов, называемого нейстоном. Бактерии, обитающие в ПМС, или бактерионейстон, являются важным компонентом водных экосистем. Они играют существенную роль в поддержании физико-химических свойств ПМС, активно участвуют в обмене веществ и газов между атмосферой и гидросферой (Liss, Duce, 2005). Показано важное значение бактерионейстонных сообществ в глобальном цикле углерода (Kuznetsova, Lee, 2001; Cunliffe et al., 2009).

Множество работ посвящено изучению бактерионейстона морских водоемов (Зайцев, 1970; Garrett, 1965; Dietz et al., 1976; Franklin et al., 2005; Cunliffe et al., 2011; Santos et al., 2014 и др.); информации о бактериях ПМС пресноводных экосистем значительно меньше (Заварзин, 1955; Maki, Remsen, 1989; Sarmiento et al., 2015 и др.). В последние два десятилетия особое внимание уделяется молекулярной экологии микробных сообществ ПМС. С применением молекулярно-генетических методов удалось выявить значительное разнообразие бактерионейстона морских водоемов (Agogue et al., 2004; Aller et al., 2005; Azevedo et al., 2012 и др.). До настоящего времени слабо изученными остаются видовой состав и физиолого-биохимические свойства бактерий, населяющих поверхностный микрослой пресных водоемов, что затрудняет понимание роли бактерионейстонных сообществ в функционировании пресноводных экосистем.

На озере Байкал исследование нейстона проводил В. М. Никитин в конце 1970-х – в начале 1980-х годов, им была определена численность и описаны физиологические группы бактерий в поверхностной пленке (Никитин, 1976, 1979, 1983).

Цель работы. Изучить бактериенейстонные сообщества озера Байкал на основании качественных и количественных характеристик, определяющих их состав, структуру и функционирование.

Задачи:

1. Определить количественные характеристики, провести сравнительный анализ численности бактерий в поверхностном микрослое и подповерхностном слое воды озера Байкал, оценить экологические факторы, влияющие на численность бактерий в поверхностном микрослое.

2. Выяснить таксономический состав, генетическое разнообразие и структуру бактериенейстонных сообществ озера Байкал с помощью молекулярно-биологических методов, включая высокопроизводительное секвенирование.

3. Определить роль бактерий, изолированных из поверхностного микрослоя озера Байкал, в трофической структуре сообщества, охарактеризовав полученные культуры комплексом методов, и сформировать из них коллекцию.

Научная новизна работы. Проведено комплексное изучение микробных сообществ поверхностного микрослоя воды самого крупного и древнего пресного озера в мире – озера Байкал. Впервые проведены сравнительные исследования различных методов отбора проб бактериенейстона в пресных водоемах. Впервые оценена численность бактерий в поверхностном микрослое в различные сезоны года методом эпифлюоресцентной микроскопии, изучено их пространственное распределение, выявлена зависимость от различных экологических факторов. Создана и охарактеризована коллекция чистых культур бактерий из поверхностного микрослоя озера Байкал. Впервые с использованием современных молекулярно-генетических методов и биоинформационного анализа данных получены сведения о таксономическом разнообразии бактериенейстонных сообществ озера Байкал.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты работы позволили значительно расширить знания о составе и функционировании бактериенейстонных сообществ пресноводных экосистем. Сведения о составе и разнообразии микробных сообществ поверхностного микрослоя, а также об их физиолого-биохимических свойствах являются первым шагом в определении функциональной активности этих бактерий и установлении их роли как в обмене химических элементов между атмосферой и гидросферой, так и в круговороте веществ в водоеме. Полученные результаты могут быть использованы в курсах лекций по экологии и микробиологии. Сведения о ферментативной активности микробных сообществ ПМС позволяют судить об их потенциале в самоочищении водоема от органических загрязнителей, накапливающихся в поверхностном микрослое. Данные о ферментативной активности штаммов гетеротрофных бактерий, выделенных из поверхностной пленки, могут быть использованы для разработки микробиологических методов борьбы с загрязнением водоемов

различными органическими поллютантами, такими как полиароматические углеводороды.

Положения, выносимые на защиту:

1. Бактерионейстон озера Байкал характеризуется высокой численностью, сезонной изменчивостью, равномерно распределен по акватории озера; численность бактерий в поверхностном микрослое находится в прямой зависимости от температуры, мутности воды, а также от концентрации органических веществ.

2. Бактериальное сообщество поверхностного микрослоя озера Байкал отличается высоким содержанием бактерий фил *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (класс *Alphaproteobacteria*, семейство *Pelagibacterales*; класс *Betaproteobacteria*, род *Limnohabitans*) и *Bacteroidetes* (род *Flavobacterium*), значительным количеством микроорганизмов с фотогетеротрофным типом метаболизма, а также большой долей представителей с гидролитической активностью. На состав, структуру и функционирование бактерионейстонного сообщества значительное влияние оказывает атмосфера и нижележащие слои воды.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на научно-практической конференции с международным участием «Питьевая вода в XXI веке» (Иркутск, 2013 г.), XXI международной научной конференции молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2014 г.), 10-й международной конференции «Экстремофилы» (Санкт-Петербург, 2014 г.), IV региональной научно-практической конференции «Экологические проблемы Байкальского региона» (Улан-Удэ, 2014 г.), VI международной Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2015 г.), 4-м Байкальском микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2015 г.), IV всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 2016 г.), на семинарах лаборатории водной микробиологии и Ученых советах ЛИН СО РАН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из них 3 статьи в рецензируемых российских изданиях, входящих в список ВАК и включенных в систему цитирования Scopus и Web of Science, а также 7 работ в материалах конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 185 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и приложения. Работа иллюстрирована 13 рисунками и 20 таблицами. Список литературы включает 214 работ, из которых 52 отечественных и 162 зарубежных.

Благодарности. Работа посвящена светлой памяти В.В. Парфеновой. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.б.н., профессору, г.н.с. лаборатории водной микробиологии В.В. Дрюккеру, к.б.н., доценту, в.н.с., заведующей лаборатории водной микробиологии О.И. Белых, академику РАН

М.А. Грачеву, д.б.н. Е.В. Лихошвай, к.б.н. Н.Л. Бельковой, д.б.н. Т.И. Земской., к.б.н. О.Н. Павловой, к.б.н. Ю.П. Галачьянцу, к.г.н. И.В. Томберг, к.г.н. М.В. Сакирко, к.г.н. В.М. Домышевой, к.г.н. В.В. Блинову, к.б.н. Е.В. Мамаевой и всем сотрудникам лаборатории водной микробиологии за помощь в проведении работы, обсуждении результатов и всестороннюю поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С использованием зарубежной и отечественной литературы приведена история исследований строения, состава и функционирования микробных сообществ водного поверхностного микрослоя, а также роли бактериоценозных сообществ в глобальных биогеохимических процессах.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были бактериальные сообщества водного поверхностного микрослоя озера Байкал. Пробы бактериоценоза отбирали по всей акватории озера Байкал в мае–июне 2013–2016 гг. и в августе 2013, 2015, 2016 гг. (рис. 1). Отбор проб проводили с лодки при помощи металлического экрана Гарретта (Garrett, 1965) и поликарбонатных фильтров (Crow et al., 1975; Kjelleberg et al., 1979). Толщину забираемого ПМС определяли как отношение объема собранного образца к площади сетки или фильтра, соответственно (Agogue et al., 2004). Для сравнительного анализа выполняли отбор проб подповерхностного слоя воды (ПСВ) шприцем с глубины 15–20 см.

Для выделения бактерий проводили посев воды на среды R2A (Sigma-Aldrich, США), рыбопептонный агар, разбавленный в 10 раз (РПА/10) (Горбенко, 1961), ПДС (г/л: пептон сухой ферментативный – 1,0, дрожжевой экстракт – 1,0, бактериологический агар – 15,0). На среде R2A культивировали психрофильные бактерии, на РПА/10 – гетеротрофные, среда ПДС служила для изоляции олиготрофных бактерий. Чистые культуры получали методом истощающих посевов до отдельных колоний.

Для определения морфологических признаков клеток бактерий и оценки общей численности применяли метод световой и эпифлюоресцентной микроскопии (краситель DAPI, SYBR Green I).

Физиолого-биохимические свойства чистых культур определяли, оценивая их способность утилизировать моно- и дисахариды, спирты, аминокислоты, а также тестируя штаммы на наличие внеклеточных ферментов: каталаза, щелочная фосфатаза, протеаза, амилаза, липаза, фосфолипаза (Практикум..., 1976; Практикум..., 2005). Для изучения ферментативной активности бактериальных сообществ нейстона и подповерхностного слоя воды *in vivo* проводили посев проб воды на молочный, крахмальный и желточный агар.

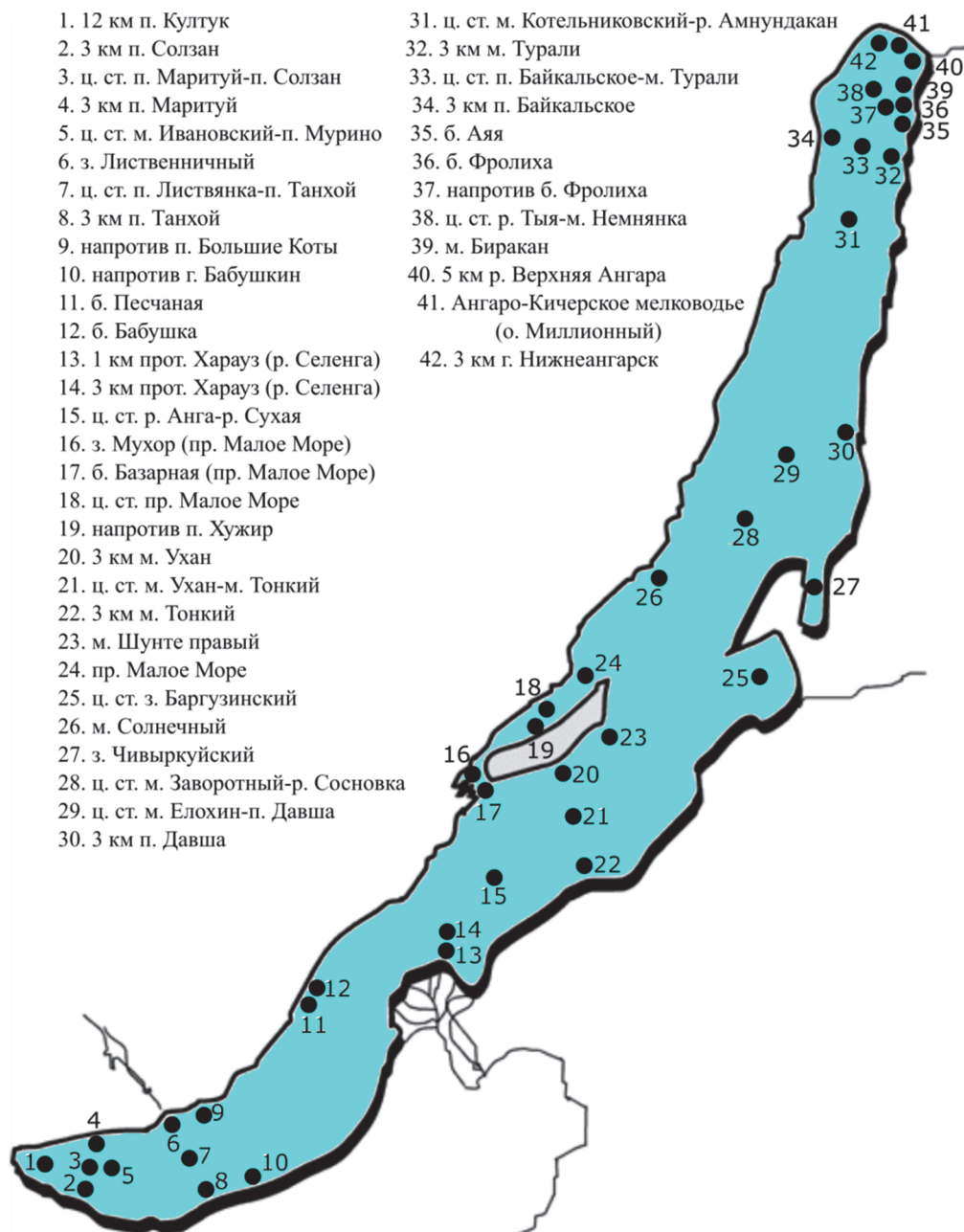


Рис. 1. Схема станций отбора проб поверхностного микрослоя на озере Байкал в 2013–2016 гг.

Молекулярно-генетическую идентификацию штаммов по фрагменту гена 16S рРНК (праймеры EUB27L– EUB1542R (Brosius et al., 1981)) осуществляли методом секвенирования по Сэнгеру. Таксономический состав бактерионейстонных сообществ исследовали при помощи пиросеквенирования. Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК проводили на праймерах V1-9F – V3-541R (май-июнь 2013 г.) и V4-518F – V6-1064R (август 2013 г.) (Chun et al. 2010; Filkins et al., 2012). Для биоинформационной обработки метагеномных данных и построения графиков использовали программу Mothur v.1.33.3 (Schloss et al., 2009) и пакеты языка программирования R 2.4-3 phyloseq (McMurdie, Holmes, 2013) и vegan (Oksanen et al., 2017). Анализ полученных последовательностей проводили в программе BLAST

сервера NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК депонированы в базу данных NCBI: LN736018, LN831989–LN832022, KU844067, KY454478–KY454528. Результаты метагеномного анализа зарегистрированы в международной базе данных NCBI: №№ PRJNA298850, PRJNA374757.

Статистическая обработка результатов проведена при помощи программы R-Studio 3.3.1 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.1.1/>).

ГЛАВА 3. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ В ПОВЕРХНОСТНОМ МИКРОСЛОЕ ВОДЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Адаптация методов отбора проб поверхностного микрослоя воды в условиях озера Байкал. Толщина водного слоя, забираемого сеткой и фильтрами в озере Байкал, составила 362–420 и 50–55 мкм, соответственно. Единовременный забор воды составил 20–23 и 0,86–0,90 мл, соответственно.

Для комплексной характеристики бактериальных сообществ нейстона озера Байкал выбран метод отбора проб металлической сеткой, поскольку она позволяет отбирать больший объем воды, достаточный для проведения всех необходимых исследований.

Распределение общей численности бактерий и численности культивируемых гетеротрофных бактерий в поверхностном микрослое и подповерхностном слое воды озера Байкал. Общую численность бактерий (ОЧБ) и численность культивируемых гетеротрофных бактерий (ЧКГБ) в поверхностном микрослое и подповерхностном слое воды определяли в 2013–2016 гг. по всей акватории озера Байкал. Средние значения ОЧБ в весенние и летние периоды приведены в таблице 1.

Таблица 1

Средние значения ОЧБ (10^6 кл/мл) и ЧКГБ (КОЕ/мл) в ПМС и ПСВ озера Байкал в весенние и летние периоды 2013–2016 гг.

Сезон	Слой воды	ОЧБ, 10^6 кл/мл	ЧКГБ, КОЕ/мл
весна	ПМС	$1,17 \pm 0,2$	715 ± 206
	ПС	$0,85 \pm 0,11$	100 ± 26
	ПМС/ПС	1,4	7,15
лето	ПМС	$2 \pm 0,31$	13390 ± 3970
	ПС	$1,28 \pm 0,16$	905 ± 147
	ПМС/ПС	1,55	14,8
лето/весна	ПМС	1,7	18,7
	ПС	1,5	9,05

Примечание. После знака «±» приводится величина стандартной ошибки среднего при уровне значимости 0,05.

Наши результаты согласуются с ранее полученными значениями для озера Байкал (Парфенова и др., 2000; Шимараев и др., 2000; Михайлов и др., 2015) и соответствуют приведенным для других пресных водоемов мира (Augustet, Casamayor, 2008; Hörtnagl et al., 2010; Sarmiento et al., 2015).

Средние значения численности культивируемых гетеротрофных бактерий в ПМС и ПСВ озера Байкал в весенние и летние периоды приведены в таблице 1. Эти значения сопоставимы с данными для летнего периода, полученными В. М. Никитиным (1983). Между численностью гетеротрофных, психрофильных и олиготрофных бактерий как в ПМС, так и в планктоне не найдено достоверных различий согласно методу Манна-Уитни-Вилкоксона (МУВ) ($p > 0,05$), что справедливо и для весеннего, и для летнего периодов. Бактерии, обитающие в поверхностном микрослое и водной толще озера Байкал, очевидно, не являются облигатными олиготрофами, поэтому хорошо растут на средах с разным содержанием питательных веществ. Численность психрофилов не отличалась от других групп бактерий, однако им требовалось больше времени на рост.

Численность культивируемых гетеротрофных бактерий и общая численность бактерий поверхностного микрослоя в пелагиали и литорали достоверно не отличались. Значимых различий не обнаружено и в межгодовой динамике количественных показателей этих двух групп как в весенние, так и в летние сезоны, то же самое показано и для бактериопланктона. В этой связи провели вычисление средних значений ОЧБ и ЧКГБ для всех весенних и летних сезонов (табл. 1).

Различия в численности между нейстонными и планктонными бактериями больше заметны при учете культивируемых форм, отличия в ОЧБ не всегда удается детектировать (Никитин, 1983; Agogue et al., 2004; Joux et al., 2006; Augustet, Casamayor, 2008; Hörtnagl et al., 2010; Sarmiento et al., 2015). Действительно, нами выявлены существенные различия между нейстоном и планктоном по численности культивируемых бактерий; различия в ОЧБ были менее значительными (табл. 1). Вероятно, применяемые среды для культивирования больше подходят по составу для бактерий поверхностного микрослоя, адаптированных к жизни в условиях избытка питательных веществ.

Летом 2013, 2015 и 2016 гг. наблюдали значимую прямую корреляционную связь между численностью культивируемых гетеротрофных бактерий в ПМС и подповерхностном слое воды (коэффициент корреляции Пирсона (ККП) составил 0,77–0,97 в разные годы, $p < 0,05$). Весной такой зависимости не обнаружили (ККП, $p > 0,05$). Корреляционная связь между общей численностью нейстонных и планктонных бактерий была достоверной во все сезоны, за исключением весны 2015 г.; ККП составил 0,67–0,9 в разные годы ($p < 0,05$). Полученные данные согласуются с результатами других исследователей (Bell, Albright, 1982; Joux et al., 2006; Santos et al., 2011). Наличие такой зависимости служит одним из доказательств теории происхождения бактерий нейстона из бактериопланктонных сообществ. Отсутствие достоверной корреляционной

связи между численностью культивируемых гетеротрофных бактерий в нейстоне и планктоне весной, также как и отсутствие различий в ОЧБ между поверхностным микрослоем и подповерхностным слоем воды, можно объяснить интенсивным перемешиванием поверхностных вод в период перехода от обратной температурной стратификации к прямой (Шимараев, Гранин, 1991).

Влияние физических факторов на численность бактерий в поверхностном микрослое и подповерхностном слое воды озера Байкал. При отборе проб металлической сеткой в условиях штиля и при наличии ветра силой до 4,9 м/с (в среднем $1,43 \pm 0,65$ м/с) не наблюдали значимой корреляционной связи между ЧКГБ в поверхностном микрослое и силой ветра как в весенний, так и в летний периоды (ККП, $p > 0,05$). Не было выявлено достоверной связи также между ОЧБ в ПМС и силой ветра (ККП, $p > 0,05$). Полученные результаты согласуются с литературными данными (Kuznetsova et al., 2004; Reinthaler et al., 2008; Wurl et al., 2011).

Установлена значимая прямая корреляционная связь между температурой поверхностной воды и ЧКГБ нейстона (ККП составил 0,57, $p < 0,05$) (рис. 2).

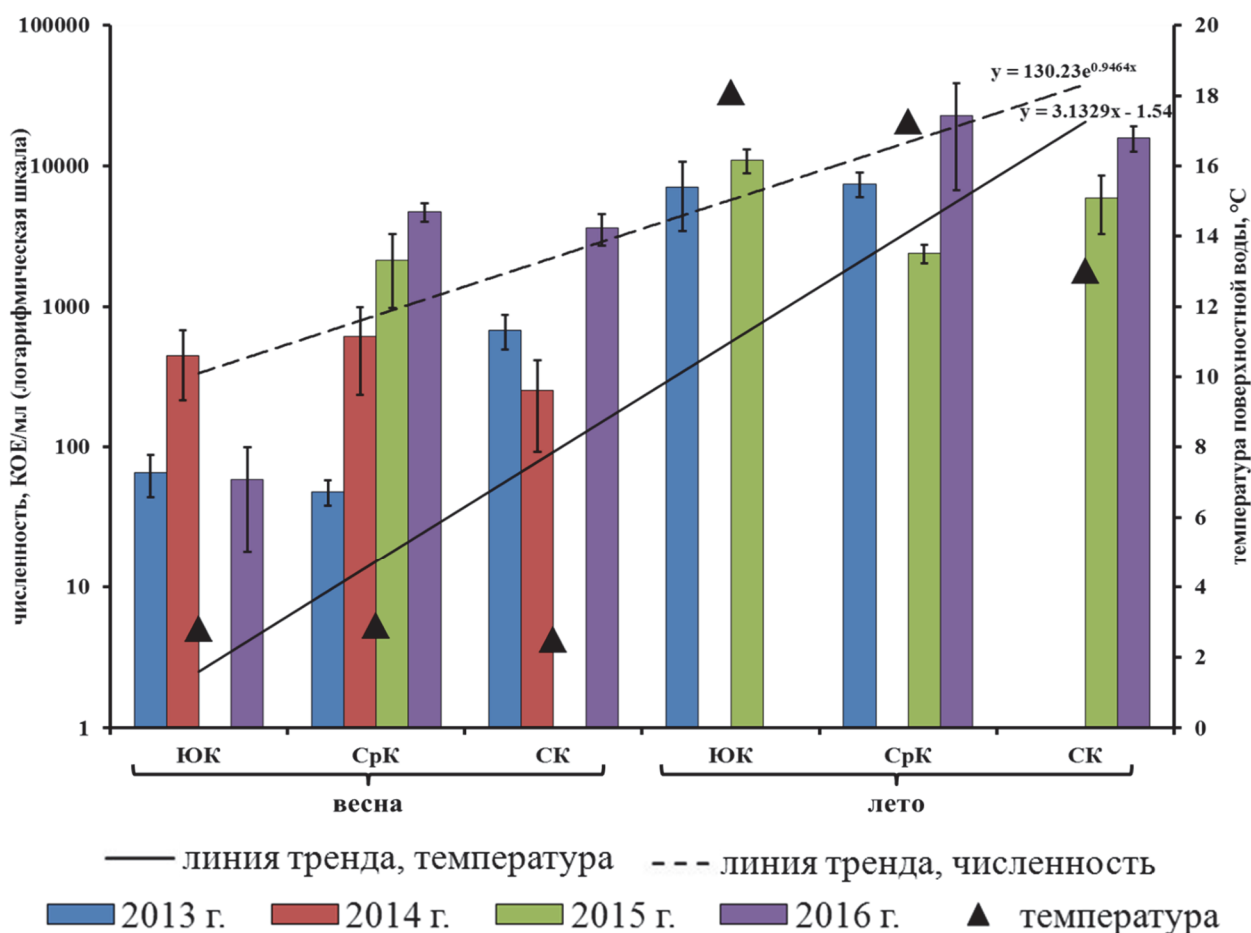


Рис. 2. Средняя численность культивируемых гетеротрофных бактерий в ПМС и температура поверхностной воды в Южной (ЮК), Средней (СрК) и Северной (СК) котловинах озера Байкал в весенние и летние периоды 2013–2016 гг.

Примечание. В качестве доверительного интервала приведены значения стандартной ошибки среднего при уровне значимости 0,05.

Получена значимая прямая корреляционная связь между общей численностью бактерий нейстона и температурой поверхностной воды, однако более слабая, чем в случае ЧКГБ (ККП составил 0,5, $p < 0,05$). В литературе установлен факт корреляции численности бактерий нейстона прежде всего с температурой поверхностной воды (Hörtnagl et al., 2010; Sarmiento et al., 2015). Таким образом, для бактерий поверхностного микрослоя озера Байкал более подходящим для роста является температурный диапазон, характерный для летнего периода, а не для весеннего.

Физико-химические особенности поверхностного микрослоя воды озера Байкал. Летом 2013 г., весной и летом 2015 г. и весной 2016 г. проведен химический анализ поверхностного микрослоя и подлежащего слоя воды на глубине 15 – 20 см (данные В.М. Домышевой, М.В. Сакирко, И.В. Томберг). В августе 2013 г. выявлены значимые отличия между поверхностным микрослоем и подповерхностным слоем воды в мутности и концентрации фосфатов (PO_4^{3-}), а также NO_2^- (ТМУВ, $p < 0,05$). Показатели в ПМС в 2 – 3,75 раз превышали концентрации химических веществ в ПСВ. Весной 2015 г. определены значимые отличия между содержанием фосфатов (PO_4^{3-}) в исследуемых слоях (ТМУВ, $p < 0,05$); показатели в ПМС примерно в 2 раза выше таковых в ПСВ. Летом 2015 г. обнаружены значимые отличия между ПМС и ПСВ в содержании органического фосфора ($\text{P}_{\text{орг}}$), а также по таким показателям, как перманганатная (ПО) и бихроматная (ХПК) окисляемость органических веществ (ТМУВ, $p < 0,05$), при этом значения в ПМС в 2 – 3 раза превышали показатели в ПСВ. Весной 2016 г. не выявлено значимых различий в концентрациях исследуемых веществ между ПМС и ПСВ (ТМУВ, $p > 0,05$). Таким образом, удалось детектировать различия в химическом составе между ПМС и ПСВ озера Байкал как в летний, так и в весенний периоды.

Найдена значимая прямая корреляционная связь между численностью как культивируемых гетеротрофных бактерий, так и ОЧБ в поверхностном микрослое и мутностью воды (ККП составил 0,69 для культивируемых бактерий и 0,87 для ОЧБ, $p < 0,05$). Показано, что бактерии, ассоциированные с частицами различного происхождения, составляют значительную долю всех бактерий, находящихся в ПМС (23 ± 1 % по данным Aller et al., 2005; 28,98–41,8 % по данным Santos et al., 2011), поэтому наличие корреляции между мутностью и численностью бактерионейстона представляется закономерным.

Летом 2015 г. выявлена значимая прямая корреляционная связь между численностью культивируемых гетеротрофных бактерий и концентрацией органических веществ как в ПМС, так и в ПСВ (показатели ПО, ХПК) ($p = 0,02$ и $0,03$, соответственно; ККП составил в обоих случаях 0,7).

ГЛАВА 4. ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ПОВЕРХНОСТНОГО МИКРОСЛОЯ ВОДЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ ПО ДАННЫМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

Состав бактериальных сообществ поверхностного микрослоя воды озера Байкал в весенний и летний периоды. Проведено исследование проб ПМС, отобранных в мае–июне и в августе 2013 г. на различных станциях озера Байкал. В результате пиросеквенирования и первичного анализа данных в образцах, отобранных в мае–июне, получено 17807 последовательностей со средней длиной 179 нуклеотидов, в августе – 23639 последовательностей со средней длиной 249 нуклеотидов. Количество чтений в пробах варьировало от 2153 до 7388 (табл. 2, 3).

Таблица 2.

Биоразнообразие микробных сообществ поверхностного микрослоя озера Байкал (кластерное расстояние 0,03), май–июнь 2013 г.

Станция отбора пробы	Число посл-стей	Число ОТЕ	Индексы разнообразия			
			СНАО1	АСЕ	Шеннона	Обратный индекс Симпсона
12 км от п. Култук	4067	191	362	554	3	8,8
3 км от протоки Харауз	6352	316	760	1123	3,4	11,4
ц. ст. п. Листвянка – п. Танхой	7388	264	449	574	3,2	13,3

Таблица 3.

Биоразнообразие микробных сообществ поверхностного микрослоя озера Байкал (кластерное расстояние 0,03), август 2013 г.

Станция отбора пробы	Число посл-стей	Число ОТЕ	Индексы разнообразия			
			СНАО1	АСЕ	Шеннона	Обратный индекс Симпсона
ц. ст. п. Листвянка – п. Танхой	5723	177	315	375,3	3,56	18,8
ц. ст. пр. М. Море	3110	112	149,71	151,37	3,47	20,8
12 км от п. Култук	4213	113	211,27	231,88	3,13	14,5
ц. ст. п. Маритуй – п. Солзан	3041	136	211,3	287,77	3,19	11,6
ц. ст. р. Анга – р. Сухая	3016	152	246,54	331,38	3,46	18,1
б. Базарная (пр. М. Море)	2383	175	281,5	374,59	3,92	28,4
3 км от прот. Харауз	2153	112	158,86	189,84	3,39	15,5

Анализ молекулярной дисперсии (АМОВА) показал, что весной значимые различия по составу и представленности флотипов существуют между микробными сообществами ПМС, отобранными на мелководной станции 3 км от протоки Харауз, и на двух глубоководных ($p < 0,01$). Значимых различий между бактерионейстонными сообществами пелагиали Байкала не обнаружено ($p = 0,111$).

В летних пробах в результате кластерного анализа выявлено, что микробиом ПМС на центральной станции пролива Малое Море отличается по составу ОТЕ от остального бактерионейстона. В нейстонных микробиомах из других районов озера отмечено относительное сходство как по представленности филоотипов, так и по структуре сообществ.

В бактерионейстонных сообществах всех станций, как весной, так и летом по количеству последовательностей и филоотипов преобладали пять фил: *Bacteroidetes* (27,1–55,1% весной и 17,4–38,3% летом), *Actinobacteria* (20,3–42,4% весной и 16,5–42,4% летом), *Proteobacteria* (15,6–22,8% весной и 13,7–31,5% летом), *Verrucomicrobia* (3,4–9,9% весной и 8,3–15,9% летом) и *Planctomycetes* (0,2–3,8% весной и 0,03–2,7% летом).

Весной на долю минорных фил в каждом микробном сообществе приходилось 0,18–0,70% последовательностей, летом – 0,12–0,99% последовательностей. К ним относились: *Acidobacteria*, *Nitrospirae*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes*, *Firmicutes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi* и Candidatus *Saccharibacteria* (весна), *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes*, *Firmicutes*, *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *Parcubacteria*, *Fusobacteria*, *OD1*, *Synergistetes* (лето).

Сравнение бактерионейстонных сообществ в мае–июне и в августе показало, что весной сообщества отличаются большим видовым богатством (индексы разнообразия ACE, СНАО, количество ОТЕ), что можно объяснить интенсивным обменом водных масс во время весенней гомотермии. В то же время индексы Шеннона и обратный Симпсона, дающие понятие о равнопредставленности филоотипов, были выше летом (табл. 2, 3), что свидетельствует о формировании в этот период более устойчивого бактериального сообщества. Методом NMDS показано, что весенние бактерионейстонные сообщества кластеризуются отдельно от летних (рис. 3). В бактериальных сообществах ПМС, отобранных летом, обнаружено больше представителей порядков *Acidimicrobiales*, *Actinomycetales* (фила *Actinobacteria*), *Bdellovibrionales*, *Burkholderiales*, *Pseudomonadales*, *Sphingomonadales* (фила *Proteobacteria*), а также не идентифицированных на уровне порядка представителей классов *Spartobacteria*, *Opitutae* (фила *Verrucomicrobia*), *Phycisphaerae* (фила *Planctomycetes*) и *Betaproteobacteria* (фила *Proteobacteria*). Весной выявлено больше бактерий порядка *Pelagibacterales* (фила *Proteobacteria*) и не идентифицированных на уровне порядка представителей фил *Actinobacteria* и *Bacteroidetes* (рис. 4).

Сравнение полученных последовательностей с известными в базе данных позволило выявить в ПМС озера Байкал бактерии, близкородственные фотогетеротрофным микроорганизмам, которые принадлежали филам *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*. В бактерионейстоне озера Байкал содержание фотогетеротрофных бактерий превышало их содержание в водной толще

пресноводных озер США, оцененное как 10–23% (Martinez-Garcia et al., 2012), и составляло на разных станциях от 17,6 до 29,7% весной и 27,4–47,5% летом.

В общей структуре фотогетеротрофных сообществ весной доминировали представители филы *Actinobacteria* – 41–43% и класса *Alphaproteobacteria* (пор. *Pelagibacterales* (SAR11) – 42–45%. Летом подавляющее количество фотогетеротрофов приходилось на филу *Actinobacteria* (51,9–73,4% от общего количества фотогетеротрофных бактерий), представители класса *Alphaproteobacteria* составляли 8,4–21,2%, класса *Betaproteobacteria* – 3,9–6%, филы *Bacteroidetes* – 4,6–30,2%.

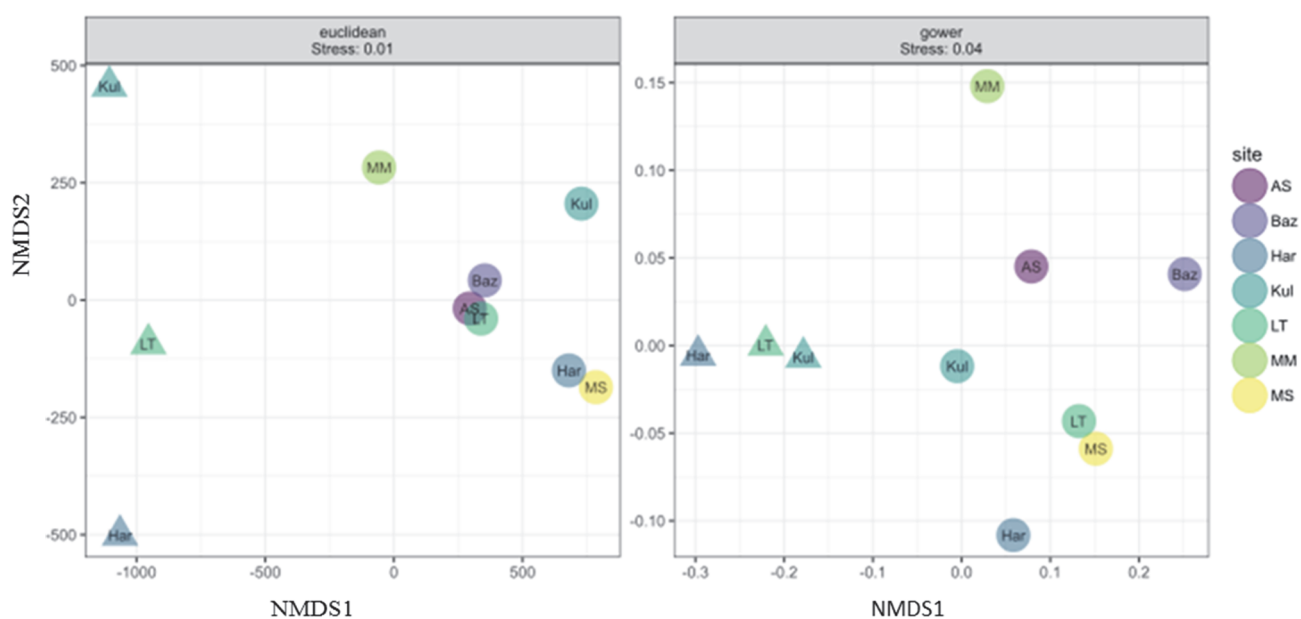


Рис. 3. Сравнительный анализ бактерионейстонных сообществ озера Байкал методом NMDS (индекс euclidean, стресс-значение 0,01; индекс gower, стресс-значение 0,04), май–июнь и август 2013 г.

Примечание. ▲ пробоотбор в мае; ● пробоотбор в августе; AS – ц. ст. р. Анга-р. Сухая; Baz – б. Базарная (пр. Малое Море); Har – 3 км прот. Харауз (р. Селенга); KU – 12 км п. Култук; LT – ц. ст. п. Листвянка-п. Танхой; MM – ц. ст. пр. Малое Море; MS – ц. ст. п. Маритуй-п. Солзан.

Большее количество фотогетеротрофов в поверхностном микрослое Байкала по сравнению с водной толщей других озер можно объяснить большей освещенностью поверхности воды, поскольку из-за отражения и поглощения взвешенными частицами вглубь проникает лишь часть света. Значительно меньшее количество фотогетеротрофов весной по сравнению с летним сезоном объясняется, скорее всего, активным перемешиванием поверхностных вод весной во время перехода от обратной температурной стратификации к прямой.

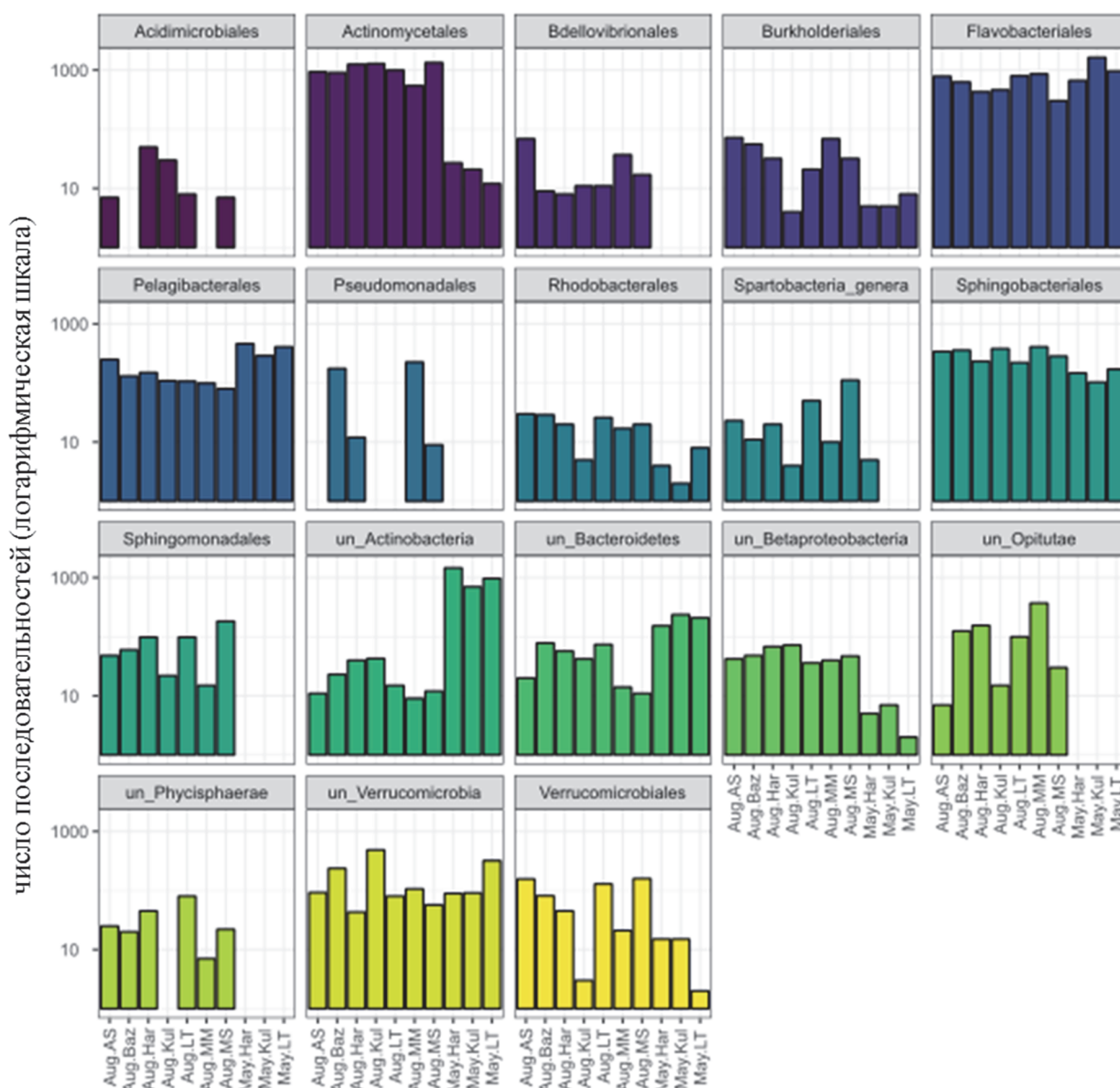


Рис. 4. Представленность таксонов на уровне порядка в бактерионейстонных сообществах, отобранных в мае–июне и августе 2013 г.

Примечание. Мау – пробоотбор в мае–июне; Aug – пробоотбор в августе; AS – ц. ст. р. Анга-р. Сухая; Baz – б. Базарная (пр. Малое Море); Har – 3 км прот. Харауз (р. Селенга); KU – 12 км п. Култук; LT – ц. ст. п. Листвянка-п. Танхой; MM – ц. ст. пр. Малое Море; MS – ц. ст. п. Маритуй-п. Солзан; un–неидентифицированные на уровне порядка представители. Значения встречаемости выравнены относительно медианы глубины прочтения каждой пробы. Отфильтрованы таксоны с количеством последовательностей < 100.

Эукариоты поверхностного микрослоя воды озера Байкал, детектированные по последовательностям гена 16S рДНК хлоропластов.

В пробах ПМС, отобранных в мае–июне 2013 г., обнаружено 6737 последовательностей гена 16S рРНК хлоропластов эукариот, что составило 27,4% от общего количества последовательностей гена 16S малой рибосомной

субъединицы про- и эукариотических организмов. В нейстонных сообществах, исследованных в августе 2013 г., выявлено 1172 последовательности гена 16S рРНК, принадлежащих эукариотам, что составило 4,9% от общего числа последовательностей. Выделено 111 и 21 ОТЕ с кластерным расстоянием 0,03, соответственно. Полученные последовательности идентифицированы в базах данных с валидированной таксономией. В мае–июне в ПМС определено 10 фил, в августе – 5 фил эукариот. Весной в нейстонных сообществах подавляющее большинство последовательностей – 6266 (93%) – отнесено к водорослям, среди них представители родов *Aulacoseira*, *Stephanodiscus*, *Thalassiosira*, *Gyrosigma*, *Synedra*, *Chlorella*, *Chroomonas*, *Dinophysis*, *Pavlova* и другие. 271 последовательность гена 16S рРНК (4%) принадлежала хлоропластам наземных растений (представители филы *Streptophyta*), среди них листостебельные и древовидные мхи, папоротник, хвощ, кедр, клещевина, тополь и другие. В сообществах, исследованных летом, все обнаруженные эукариоты определены как водоросли, среди них доминировали представители рода *Chrysochromulina* (634 последовательности, 54,1%) и *Ochromonas* (286 последовательностей, 24,4%). Также были обнаружены представители родов *Bolidomonas*, *Florenciella*, *Koliella*, *Nannochloropsis*, *Synedra*, *Teleaulax* и *Tetraselmis*.

Присутствие в ПМС ДНК наземных растений свидетельствует о попадании пыльцы на поверхность воды, что указывает на тесную связь ПМС не только с водной, но и наземной средой обитания. Большое количество водорослей в весенних пробах ПМС связано с массовым развитием фитопланктона в этот период, а также с активным перемешиванием водных слоев во время весенней гомотермии, поскольку этот процесс способствует попаданию водорослей на поверхность.

ГЛАВА 5. ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ПОВЕРХНОСТНОГО МИКРОСЛОЯ ВОДЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

Разнообразие и физиолого-биохимические свойства гетеротрофных бактерий, выделенных из поверхностного микрослоя воды озера Байкал. Из поверхностного микрослоя путем культивирования на различных питательных средах получена коллекция гетеротрофных бактерий – 87 штаммов. По результатам определения нуклеотидных последовательностей в базах данных с валидированной таксономией близкородственные гомологи 45 (52%) из 87 штаммов бактерий выделены из наземных сред обитания. Это является доказательством аэрозольного пути попадания бактерий в поверхностный микрослой с сохранением их жизнеспособности. Также бактерии с высоким процентом сходства с байкальскими штаммами были выделены из воды, льда, биопленок, донных осадков, растений и цианобактериальных матов. Близкородственные гомологи 36 штаммов (41%) изолированы из холодных мест обитания – из арктических, антарктических, альпийских почв и водоемов, ледников, высокогорных озер, что свидетельствует об адаптации к жизни в условиях низких температур, характерных для озера Байкал.

Подавляющее большинство выделенных бактерий принадлежало филе *Proteobacteria* – 59 штаммов (67,8%). Из них 25 штаммов оказались представителями класса *Alphaproteobacteria*, 19 штаммов – класса *Betaproteobacteria*, 15 штаммов – класса *Gammaaproteobacteria*. 15 штаммов (17,2%) отнесены к филе *Bacteroidetes*, 7 штаммов (8%) – к филе *Actinobacteria*, 4 штамма (5,1%) – к филе *Firmicutes* и 2 штамма (2,3%) – к филе *Deinococcus-Thermus*. Всего идентифицировано 25 различных родов бактерий.

Большинство штаммов, выделенных из ПМС, – 57 из 87 (66%) – неспособны утилизировать моно- и димерные субстраты (сахара, спирты и аминокислоты), что подтверждают и литературные данные (Joux et al., 2006; Santos et al., 2014; Sarmiento et al., 2015). В то же время многие изолированные из поверхностного микрослоя озера Байкал бактерии проявили активность в отношении сложных субстратов, как показано и для других водоемов (Kuznetsova, Lee, 2001; Coelho et al., 2011; Santos et al., 2014). 62 штамма (71%) проявили активность, по крайней мере, в отношении одного сложного субстрата. Высказано предположение, что внеклеточную ферментативную активность стимулируют высокие концентрации органических полимерных веществ (Santos et al., 2009), в то время как мономерные субстраты содержатся в ПМС в очень низких концентрациях (Reinthal et al., 2008).

41 из 87 (47%) полученных штаммов проявили амилолитическую активность, 34 (39%) – протеолитическую активность по отношению к казеину или желатину, 11 (13%) – липолитическую активность на трибутириновом агаре, 24 (28%) – фосфолипазную активность на желточном агаре. 52% штаммов обладали ферментом щелочной фосфатазой, 100% – каталазой. На рисунке 5 показана доля (%) представителей различных крупных таксонов бактерий, обладающих тем или иным внеклеточным ферментом. Среди представителей филы *Bacteroidetes* и класса *Betaproteobacteria* выявлено наибольшее количество амило-, протео- и липолитиков. В трофической структуре сообщества выделенные бактерии можно охарактеризовать преимущественно как гидролитиков.

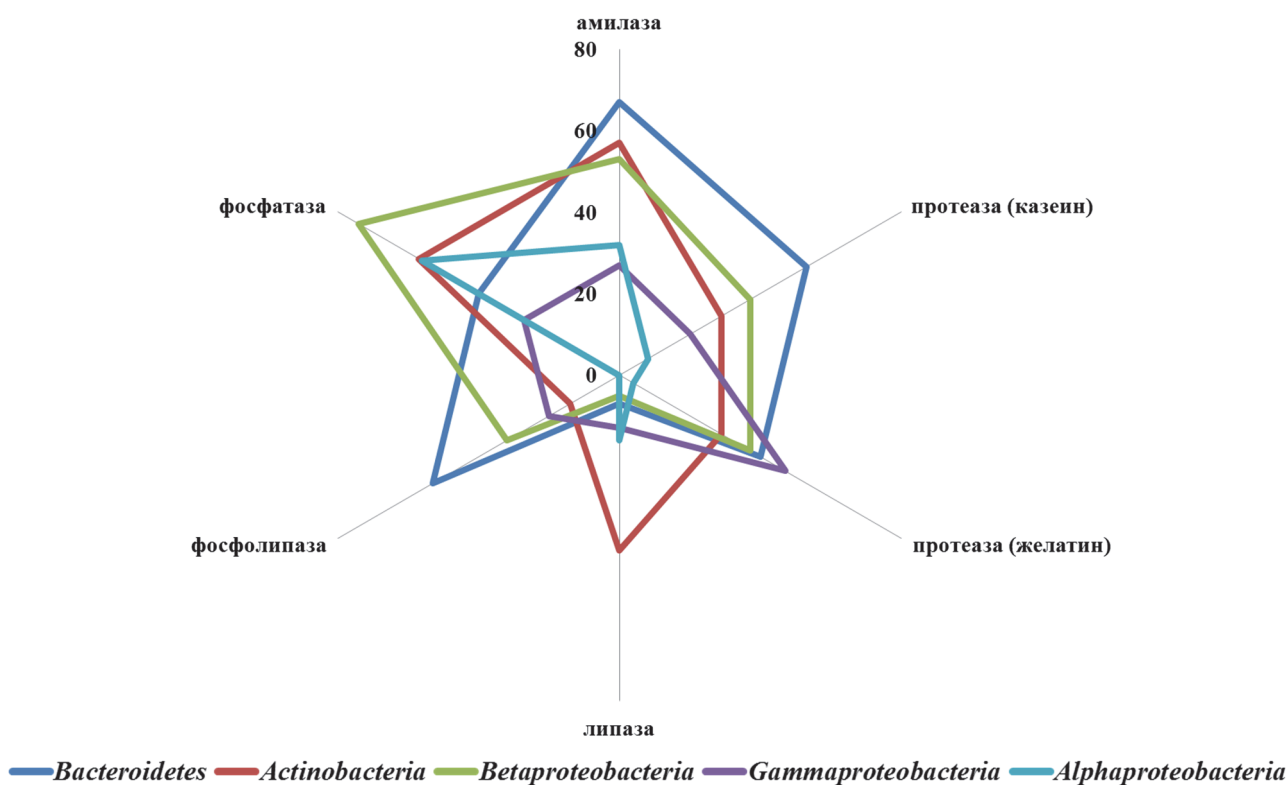


Рис. 5. Доля (%) представителей различных крупных таксонов бактерий, изолированных из поверхностного микрослоя озера Байкал, обладающих тем или иным внеклеточным ферментом.

Ферментативная активность бактериальных сообществ поверхностного микрослоя озера Байкал. Показано, что достоверные различия в активности бактериальных сообществ ПМС и ПСВ имелись только в летний период (ТМУВ, $p < 0,05$), при этом в ПМС доля активных колоний была минимум в 2 раза выше, чем в ПСВ (таблица 4).

Таблица 4.

Доля активных колоний (%) на молочном (МА), крахмальном (КА) и желточном (ЖА) агаре в ПМС и ПСВ в весенний и летний сезоны 2015–2016 гг.

Сезон	Слой воды	Доля активных колоний, %		
		МА	КА	ЖА
весна	ПМС	34,3 ± 15	39 ± 1,8	20 ± 1,9
	ПС	27,6 ± 7,6	0	47,2 ± 11
лето	ПМС	22 ± 8,8	42 ± 1	30,2 ± 7,5
	ПС	11 ± 3,3	0,1 ± 0,06	10,6 ± 3,6

Примечание. После знака «±» приводится величина стандартной ошибки среднего при уровне значимости 0,05.

В весенний период таких различий не было обнаружено (ТМУВ, $p > 0,05$). Методом МУВ выявлено, что различия как между весенними, так и между летними

сезонами являются незначительными и в ПМС, и в ПСВ ($p > 0,05$). Поэтому в таблице 4 представлены средние значения за 2015–2016 гг.

Другим результатом анализа было отсутствие значимых отличий в активности бактерионеистонных сообществ между весенними и летними периодами (ТМУВ, $p > 0,05$). При достоверных различиях в численности весной и летом доля активных бактерий оставалась неизменной.

Большая активность бактерионеистонных сообществ в отношении сложных субстратов по сравнению с планктонными связана, вероятно, с более высоким содержанием органических веществ в ПМС и, соответственно, большей приспособленностью бактерий к их разложению. Отсутствие значимых различий между ПМС и ПСВ весной можно объяснить интенсивным перемешиванием поверхностных вод в этот период.

ВЫВОДЫ

1. Нейстон озера Байкал характеризуется как уникальный биоценоз с высоким представительством бактерий с фотогетеротрофным типом метаболизма, а также более низким по сравнению с планктоном видовым разнообразием. Наибольшее количество фотогетеротрофов обнаружено в бактерионеистонных сообществах летом, также как и филоципов, имеющих близкородственных культивируемых представителей, в том числе изолированных из поверхностного микрослоя озера Байкал.

2. В составе бактериальных сообществ поверхностного микрослоя озера Байкал согласно данным метагеномного анализа ампликонов выявлено 17 фил. Доминирующими были *Bacteroidetes* (17–55%), *Actinobacteria* (17–42%), *Proteobacteria* (14–32%), *Verrucomicrobia* (3–16%) и *Planctomycetes* (0,03–3,8%). Минорные филы составляли не более 1% последовательностей в каждом бактериальном сообществе.

3. Получена коллекция чистых культур бактерий из поверхностного микрослоя озера Байкал. 68% штаммов принадлежало филе *Proteobacteria*, 17% – *Bacteroidetes*, 8% – *Actinobacteria*, 5% – *Firmicutes* и 2% – *Deinococcus-Thermus*. Всего было определено 25 различных родов бактерий путем секвенирования фрагмента гена 16S рРНК чистых культур. Ближайшие гомологи 51% штаммов, чье сходство составило не менее 98%, имели наземное происхождение, что свидетельствует об аэрозольном попадании бактерий в поверхностный микрослой с сохранением их жизнеспособности.

4. Все выделенные бактерии – строгие аэробы с хемоорганогетеротрофным типом метаболизма. Большинство (71%) относится к гидролитикам. 47% проявили амилитическую, 39% – протеолитическую, 13% – липолитическую, 28% – фосфолипазную активность. Все штаммы обладали каталазой, 52% выделяли щелочную фосфатазу. Самыми активными были представители филы *Bacteroidetes* и

класса *Betaproteobacteria*. Активность бактерионейстонных сообществ была выше планктонных в летний период, весной таких различий не наблюдали, при этом доля активных нейстонных бактерий была одинакова летом и весной.

5. Общая численность бактерий в поверхностном микрослое озера Байкал весной составила в среднем $1,17 \pm 0,2 \times 10^6$ кл/мл, в подповерхностном слое воды – $0,85 \pm 0,11 \times 10^6$ кл/мл в исследуемый период. Летом общая численность бактерий в указанных слоях составила в среднем $2 \pm 0,31$ и $1,28 \pm 0,16 \times 10^6$ кл/мл, соответственно. Численность культивируемых гетеротрофных бактерий весной в поверхностном микрослое составила в среднем 715 ± 206 КОЕ/мл, в подповерхностном слое воды – 100 ± 26 КОЕ/мл. Летом численность культивируемых гетеротрофных бактерий в указанных слоях воды составила 13390 ± 3970 и 905 ± 147 КОЕ/мл, соответственно. Бактериальное сообщество нейстона отличается от планктонного большей долей культивируемых гетеротрофных бактерий.

6. Численность культивируемых гетеротрофных бактерий и общая численность бактерий как в поверхностном микрослое, так и в подповерхностном слое воды зависят от температуры воды, определяемой временем года, а также от концентрации органических веществ. Найдена значимая корреляционная связь между общей численностью бактерий и мутностью воды в поверхностном микрослое, который отличается от подповерхностного слоя воды повышенным содержанием взвешенных частиц, а также между численностью культивируемых гетеротрофных бактерий и мутностью воды в поверхностном микрослое.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Galachyants A. D.** Methods of neuston sampling for the quantitative characteristic of microbial communities of Lake Baikal / **A. D. Galachyants**, N. L. Bel'kova, E. V. Sukhanova, V. V. Blinov, V. V. Parfenova // *Inland Water Biology*. – 2016. – V. 9, № 3. – P. 329–336.

2. **Галачьянц А. Д.** Разнообразие и физиолого-биохимические свойства гетеротрофных бактерий, выделенных из нейстона озера Байкал / **А. Д. Галачьянц**, Н. Л. Белькова, Е. В. Суханова, В. А. Романовская, Г. В. Гладка, Е. Д. Бедошвили, В. В. Парфенова // *Микробиология*. – 2016. – Т. 85, № 5. – С. 568–579.

3. **Галачьянц А. Д.** Особенности таксономического состава бактерионейстонных сообществ озера Байкал / **А. Д. Галачьянц**, Н. Л. Белькова, Е. В. Суханова, Ю. П. Галачьянц, А. А. Морозов, В. В. Парфенова // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86, № 2. – С. 229–238.

В материалах конференций:

4. **Галачьянц А. Д.** Исследование бактерионейстонного сообщества озера Байкал / **А. Д. Галачьянц**, Е. В. Суханова, Е. А. Кузнецова, Н. Л. Белькова,

В. В. Парфенова // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Питьевая вода в XXI веке». Иркутск, 2013. – С. 19–21.

5. **Галачьянц А. Д.** Характеристика штамма *Deinococcus* sp. 14A2, выделенного из поверхностного микрослоя воды озера Байкал / **А. Д. Галачьянц**, Е. В. Суханова, Е. А. Зименс, Н. Л. Белькова, В. В. Парфенова // Материалы IV Региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Экологические проблемы Байкальского региона». Улан-Удэ, 2014. – С. 102–107.

6. **Galachyants A. D.** Physiological and Biochemical Characteristics of Heterotrophic Microorganisms Isolated from Surface Microlayers of Lake Baikal / **A. D. Galachyants**, E. V. Sukhanova, G. V. Gladka, E. A. Siemens, N. L. Belkova, V. V. Parfenova // 10th International Congress on Extremophiles «Extremophiles 2014». Saint Petersburg, 2014. – P.142.

7. **Галачьянц А. Д.** Устойчивость микроорганизмов нейстонной пленки оз. Байкал к ультрафиолетовому излучению / **А. Д. Галачьянц**, Е. В. Суханова, Е. А. Зименс, Г. В. Гладка, Н. Л. Белькова, В. В. Парфенова // XXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2014». Москва, 2014. – С. 203.

8. **Галачьянц А. Д.** Метагеномный анализ бактерионейстонных сообществ озера Байкал / **А. Д. Галачьянц**, Н. Л. Белькова, Е. В. Суханова, В. В. Парфенова // Шестая Международная Верещагинская Байкальская Конференция 2015. Иркутск, 2015. – С. 87–88.

9. **Галачьянц А. Д.** Разнообразие представителей рода *Sphingomonas* в нейстонной пленке озера Байкал / **А. Д. Галачьянц**, Н. Л. Белькова, Е. В. Суханова, В. В. Парфенова // 4-й Байкальский Микробиологический Симпозиум с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (BSM – 2015). Иркутск, 2015. – С. 262–263.

10. **Галачьянц А. Д.** Разнообразие бактерионейстонных сообществ озера Байкал в период максимального прогрева поверхностных вод / **А. Д. Галачьянц**, Н. Л. Белькова, Е. В. Суханова, Ю. П. Галачьянц, В. В. Парфенова // IV Всероссийская конференция молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы». Улан-Удэ, 2016. – С. 20.

ГАЛАЧЬЯНЦ Агния Дмитриевна
ПОВЕРХНОСТНЫЙ МИКРОСЛОЙ ОЗЕРА БАЙКАЛ: ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СОСТАВ,
ЧИСЛЕННОСТЬ И АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ
Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано к печати 18.10.2017
Формат 60*84/16. Объем 1,4 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 047-17
Отпечатано в РИО ИНЦХТ с готового оригинал-макета.
664003, г. Иркутск, ул. Борцов Революции, 1, тел. (3952) 29-03-70