

На правах рукописи

ГАРАНКИНА Валентина Петровна

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА
МЕЛКОВОДНЫХ ЗАЛИВОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

03.02.08 – экология (биологические науки)

03.02.03 – микробиология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ - 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Научный руководитель: **Дагурова Ольга Павловна**
кандидат биологических наук

Официальные
оппоненты: **Земская Тамара Ивановна**
доктор биологических наук, в.н.с.
Лимнологический институт СО РАН

Гайнутдинова Елена Александровна
кандидат биологических наук, старший
преподаватель, Бурятский государственный
университет

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биологии
внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Защита диссертации состоится «26» марта 2012 г. в 16⁰⁰ ч. на
заседании Диссертационного совета Д 212.022.03 в Бурятском
государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул.
Смолина, 24а, биолого-географический факультет, конференц-зал.

Факс: (3012)210588

E-mail: d21202203@mail.ru

G_val_82@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского
государственного университета.

Автореферат разослан 24 февраля 2012 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Шорноева Н.А.

Общая характеристика исследования

Актуальность проблемы. Байкал – одно из величайших озер мира, характеризующееся разнообразием биотопов. Мелководные заливы озера Байкал (соры) по своим экологическим условиям отличаются от участков открытого Байкала. Мелководье исследованных заливов отличается хорошей прогреваемостью в летний период и высокой продуктивностью (Кулагин, Помазкина, 1977). В заливах формирование химического состава воды зависит от множества факторов, главным из которых является речной сток, благодаря которому вода несколько обогащена органическим веществом и характеризуется увеличением содержания компонентов ионного состава и аллохтонного органического вещества, вследствие подтока речных вод (Мещерякова, Верболова, 1977).

Одним из существенных компонентов биоты озера являются микроорганизмы, играющие важную роль в круговороте веществ и энергии. Функционирование микробных сообществ организмов в комплексе с другими природными особенностями Байкала влияет на формирование химического состава и обеспечивает высокое качество байкальской воды. Микробные сообщества водной толщи и донных осадков открытого Байкала достаточно хорошо исследованы (Младова, 1975; Максимова, Максимова, 1989; Максимова и др., 1991; Белькова и др., 1996; Намсараев, Земская, 2000; Земская, 2007 и др.), также изучалось микробное сообщество дельты реки Селенга (Младова, 1971; Максименко и др., 2008). В мелководных заливах озера Байкал разнообразие и активность микроорганизмов практически не изучено.

Исследование микробных сообществ мелководных заливов озера важно для характеристики роли микробного сообщества в круговороте веществ и энергии экосистемы озера Байкал, поэтому изучение структуры и функционирования микробного сообщества мелководных заливов озера Байкал является актуальной задачей.

Цель исследования: изучить структуру и функционирование микробного сообщества в мелководных заливах озера Байкал.

Основные задачи исследования:

1. выявить физико-химические условия среды обитания микроорганизмов воды и осадков мелководных заливов озера Байкал;
2. определить численность бактерий в воде и осадках;
3. определить величины продукции и деструкции органического вещества в заливах;
4. изучить пространственную и сезонную динамику развития микробных сообществ;

5. провести характеристику разнообразия микробного сообщества исследуемых участков микробиологическими и молекулярно-биологическими методами;
6. выявить основные факторы, влияющие на функционирование микробного сообщества воды и осадков мелководья.

Научная новизна. Впервые получены и обобщены данные по видовому разнообразию и функциональной активности микробного сообщества воды и осадков мелководных заливов озера Байкал. Установлено, что показатели численности и активности микробного сообщества заливов были выше, чем в фоновых участках. Выявлена значительная доля сапрофитных бактерий в заливах, особенно в воде. Впервые охарактеризовано разнообразие некультивируемого микробного сообщества заливов с применением молекулярно-биологических методов, показано, что доминирующими являются такие группы микроорганизмов Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria и Acidobacteria. Выделенные культуры сапрофитных бактерий идентифицированы как представители родов *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromicrobium*, *Agrococcus*. Впервые установлена приоритетность основных факторов, влияющих на экосистему воды и осадков мелководья.

Практическая ценность. Выявленные закономерности распространения и активности микроорганизмов в воде и осадках мелководных заливов озера Байкал могут использоваться для разработки принципов управления функционированием водных экосистем, при моделировании и прогнозировании процессов переноса вещества в Байкале, а также при обосновании системы мониторинга качества его вод. Полученные данные расширяют представления о филогенетическом и функциональном разнообразии микробных сообществ озера Байкал и могут быть применены при разработке учебных курсов по экологии и байкаловедению. В базе данных EMBL зарегистрированы 15 последовательностей, данная информация может быть использована для выяснения родственных связей среди микроорганизмов различных географических местообитаний и разработки системы праймеров для оценки их количественных характеристик.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на XII международной научной школе-конференции студентов и молодых ученых «Экология Южной Сибири и сопредельных территорий» (Абакан, 2008); IV и V молодежных школах-конференциях с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2008, 2009); XIII Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2009); X съезде Гидробиологического общества при РАН (Владивосток, 2009), всероссийской конференции с международным участием «Современные

проблемы микробиологии Центральной Азии» (Улан-Удэ, 2010); всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Удэ, 2010); V Верещагинской конференции (Иркутск, 2010); на II международной научной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (Улан-Удэ, 2011); на международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ – Улаанбаатар, 2011); Байкальском Микробиологическом Симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (Иркутск, 2011).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 2 работы в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 125 страницах, включая 29 таблиц и 22 рисунка. Диссертация состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Объекты и методы», «Результаты и обсуждение» «Выводы», «Список литературы» (178 наименований) и приложения.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю к.б.н. О.П. Дагуровой, к.б.н. В.Б. Дамбаеву, д.б.н. Б.Б. Намсараеву и всем сотрудникам лаборатории микробиологии ИОЭБ СО РАН за помощь и поддержку. Автор особо признателен к.б.н. Н.Л. Бельковой и к.б.н. С.В. Зайцевой за неоценимую помощь в выполнении исследований и обсуждении результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 0804-98018p_сибирь_a.

Содержание работы

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Приведены литературные данные, посвященные морфолого-гидрологической и физико-химической характеристикам мелководных заливов озера Байкал, расположенных в придельтовом пространстве р. Селенга. Обсуждены численность и разнообразие микроорганизмов озера Байкал, роль микробных сообществ в функционировании экосистемы.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для диссертации послужили результаты исследований, полученные в ходе сезонных наблюдений в мелководных и фоновых участках озера Байкал (2008–2011 гг.). Было отобрано и проанализировано более 100 проб воды и осадков в различные сезоны года.

Объектами исследования явились мелководные заливы озера Байкал, находящиеся в придельтовом пространстве реки Селенга: Провал, Посольский Сор, Сор Черкалов и два фоновых (контрольных) участка открытого Байкала Боярск и Энхалук, расположенные вблизи от заливов. Заливы связаны с озером узкими и песчаными косами, расчлененными различными прорвами, во время ветров влияние на заливы оказывают потоки воды озера и реки Селенга.

Температуру воды измеряли с помощью сенсорного электротермометра Prima (Португалия). Показатели pH среды, Eh и минерализации измеряли при помощи полевого pH-метра рНер (Португалия), измерителя редокс-потенциала ORP (Португалия) и портативного тестер-кондуктометра TDS-4 (Сингапур), соответственно. Концентрацию гидрокарбонатов определяли титриметрическим методом, кислорода - методом Винклера (Winkler, 1888) и с помощью оксиметра Oxi 315i (Германия). Содержание в воде и осадках катионов и анионов анализировали по общепринятым в гидрохимии методам (Алекин и др., 1973). Содержание органического углерода в осадках определяли по методу Тюрина в модификации Никитина (Никитин, 1972), углеводов – фенолсерноокислым методом Дюбуа (Dubois et al., 1956), белка – по реакции с кумасси синим (Bradford, 1976). Содержание стабильных изотопов углерода ^{12}C и ^{13}C в виде газообразной формы CO_2 измеряли на масс-спектрометре МИ-1201.*

Общую численность микроорганизмов в воде и осадках определяли путем подсчета на мембранных фильтрах, окрашенных эритрозином (Романенко, Кузнецов, 1974). Учет численности жизнеспособных клеток микроорганизмов проводили методом 10 кратных разведений на элективных средах (Кузнецов, Дубинина, 1989). Численность сапрофитных бактерий подсчитывали на среде РПА 1:10, целлюлозоразлагающих бактерий - на среде Пфеннига (Pfennig, 1965) с фильтровальной бумагой.

Скорость процессов продукции и деструкции в воде определяли по методу Винберга, скорость аэробной и анаэробной деструкции в осадках – после инкубации в стеклянной колонке (Романенко, Кузнецов, 1974). Скорость разложения белка и целлюлозы оценивали аппликационным методом (Гельцер, 1986). Скорость микробных процессов анализировали радиоизотопным методом (Беляев, Иванов, 1975; Намсараев и др., 1995). Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике Rackbeta (Швеция).

Выделение ДНК производили 4 методами: 1) с помощью коммерческих наборов ДНК-сорб и РИБО-сорб (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва); 2) методом ферментативного

* Определено к.б.н. В.Б. Дамбаевым в ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН

лизиса; 3) методом модифицированной очистки с цетавлоном (Грачев и др., 2006); 4) с помощью коммерческого набора АхуPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Ахуgen, США). В работе были использованы праймеры, комплементарные наиболее консервативным участкам гена 16S рРНК. Амплификацию фрагмента ДНК вели на амплификаторе БИС (Россия). ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе-флуориметре «Амплиспект» (Россия).

Клонирование включало лигирование целевых ампликонов в плазмидный вектор с помощью набора GeneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas) и трансформацию компетентных клеток *Escherichia coli* (штамм DH-5L). Селективный отбор клонов со вставкой нужной длины был основан на положительной селекции всех выросших клонов. Секвенирование проводили в Межинститутском центре секвенирования ДНК (г. Новосибирск) на автоматических секвенаторах ABI310A и ABI 3130xl (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, США).

Нуклеотидные последовательности проверяли и корректировали с помощью программы Bioedit, поиск химерных структур вели с помощью пакета программ Pintail, сравнительный анализ - с помощью пакета программ FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>). Для выравнивания набора последовательностей использовали программу ClustalW, далее выровненные последовательности использовали для построения филогенетического дерева в программе MEGA ver. 5.01.

Пиросеквенирование проведено в Chunlab Inc. (Сеул, Южная Корея) на секвенаторе Roche/454 GS-FLX Titanium. Таксономическое разнообразие микробного сообщества оценивали с помощью программы CLcommunity (ver. 2.58).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами. Массивы многомерных данных анализировали методом главных компонент. Все расчеты выполнены с использованием пакета программ MathLabR 2010a и Excel 2003 для Windows.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Физико-химические показатели воды и осадков мелководных заливов озера Байкал

В период исследования температурные колебания воды в сорах находились в пределах 1,2-24,1°C, в фоновых участках температурные значения были ниже и составляли 1,1-20,6°C (табл. 1). Значения pH колебались от 5,8 до 8,9. Максимальные значения pH зафиксированы в воде залива Провал, минимальные - в Боярске. Наиболее минерализованной была вода Сора Черкалов. Концентрация гидрокарбонатов больше в тех участках, где высока минерализация.

Максимальное значение окислительно-восстановительного потенциала в осенний период определено в фоновых участках, достигая +280 мВ. Растворенный кислород в заливах присутствовал в концентрации 5,1-18,6 мг/л, показатель в фоновых участках был немного ниже. В целом, значения физико-химических показателей, в том числе анионно-катионного состава воды, не превышали средние для озера (Атлас Байкала, 1993), однако в отдельных образцах обнаруживалось увеличение значений показателей по сравнению с химическим составом водной толщи открытого Байкала.

Таблица 1

Физико-химическая характеристика воды мелководных заливов и фоновых участков озера Байкал

Место-положение	t, °С	pH	Минерализация, мг/л	O ₂ , мг/л	HCO ₃ ⁻ , мг/л
Залив Провал	<u>1,3-21,3</u> 12,1 ±8,20	<u>7,6-8,9</u> 8,3 ±0,4	<u>39,6-147,8</u> 117,3±40,8	<u>6,4-18,2</u> 12,2 ±4,5	<u>48,8-134,2</u> 92,7±26,7
Залив Посольский Сор	<u>1,2-24,1</u> 15,1 ±8,7	<u>6,3-8,3</u> 7,8 ±0,6	<u>9,0-81,1</u> 58,2±25,7	<u>5,1-18,6</u> 9,8 ±4,2	<u>24,4-67,1</u> 46,9 ±11,5
Залив Сор Черкалов	<u>5,1-22,0</u> 14,0 ± 11,9	<u>7,8-8,1</u> 7,9 ±0,2	<u>135,1-162,2</u> 148,7±19,1	<u>6,7-9,4</u> 8,1 ±1,9	<u>103,7-115,9</u> 109,8 ±8,6
Боярск, фон	<u>1,2-14,4</u> 16,0 ± 5,6	<u>5,8-8,5</u> 7,5 ±0,8	<u>16,2-109,9</u> 65,9±33,1	<u>8,0-11,8</u> 10,0 ±1,1	<u>24,4-109,8</u> 66,0 ±26,6
Энхалук, фон	<u>1,1-20,6</u> 10,3 ±14,6	<u>7,7-8,8</u> 7,6 ±0,1	<u>109,9-117,1</u> 113,5±5,1	<u>7,0-9,0</u> 8,0 ±1,4	<u>85,4-91,5</u> 88,5±4,3

В числителе – минимальные и максимальные значения, в знаменателе – средние значения

Осадки в заливах были представлены илами и среднезернистыми песками, содержание C_{орг} в которых составляло 0,03-7,32% и зависело от типа осадка (табл. 2). Максимальные и минимальные значения отмечены в осадках залива Провал, где происходит неравномерное распределение органического вещества, на которое оказывают влияние река Селенга, изменения рельефа дна и гранулометрического состава осадков. В песчаных осадках фоновых участков содержание C_{орг} было ниже и составляло в среднем 0,22%. По значениям изотопного состава органического вещества (от -26,1‰ до 33,2‰) можно судить, что органическое вещество в сорах в основном синтезируется фитопланктоном и прибрежной растительностью. Известно, что в Байкале основным продуцентом органического вещества является фитопланктон, что справедливо и для мелководных заливов. Кроме этого, значительную роль в продукции заливов играет аллохтонное органическое вещество и вещество, продуцируемое прибрежной растительностью (Вотинцев и др., 1975), что согласуется с нашими данными.

Таблица 2

Физико-химическая характеристика осадков мелководных заливов и фоновых участков озера Байкал

Местоположение	Тип осадка	C _{орг} , %	C _{углеводов} , %	Белок, %	¹³ δ С ОВ, ‰
Залив Провал	Заиленный песок, ил	<u>0,03-7,32</u> 1,20±2,04	-	-	-28,098±-4,30
Залив Посольский Сор	Мелкозернистый песок	<u>0,27-0,98</u> 0,36±0,30	<u>0,01-0,70</u> 0,15±0,27	<u>0,024-0,044</u> 0,03±0,007	-31,57±-1,67
Залив Сор Черкалов	Заиленный песок	1,00	0,56	0,35	-
Боярск, фон	Крупнозернистый песок	<u>0,1-0,2</u> 0,15±0,71	<u>0,001-0,020</u> 0,009±0,006	<u>0,0005-0,0530</u> 0,02±0,019	-33,19
Энхалук	Среднезернистый песок	<u>0,24-0,34</u> 0,29±0,07	<u>0,011-0,015</u> 0,013±0,003	0,07	-

Прочерк – отсутствие данных

3.2. Численность микроорганизмов в мелководных заливах озера Байкал

Средние значения общей численности микроорганизмов (ОЧМ) в воде заливов и фоновых участков побережья Байкала были сопоставимы – 2,0-2,6 млн кл/мл, однако микробное сообщество в заливах было чуть более многочисленным (табл. 3). Такая же закономерность была характерна для распределения численности сапрофитных и целлюлозоразлагающих бактерий. Средняя численность сапрофитов в заливах достигала 1,9 млн кл/мл (фон - 1,2 млн кл/мл), целлюлолитиков - 55 тыс кл/мл (фон – 0,21 тыс кл/мл). Максимальные значения численности сапрофитов и целлюлолитиков были характерны для залива Сор Черкалов. Обнаружена высокая доля сапрофитных бактерий в микробном сообществе воды изученных заливов. Наличие большого числа сапрофитных бактерий, являющимися индикаторами поступления органического вещества в водоемы, характерно для прибрежной зоны озера Байкал (Максимова, Максимов, 1989).

Таблица 3

Численность бактерий в прибрежной воде соров и контрольных участков озера Байкал

Место отбора	ОЧМ, млн. кл/мл	Численность сапрофитных бактерий, млн. кл/мл	Численность целлюлозо- разлагающих бактерий, тыс. кл/мл
Залив Провал	<u>0,90-7,40</u> 2,61 ±1,50	<u>0,15-7,30</u> 1,84 ±1,77	<u>0,01-1,00</u> 0,19 ±0,35
Залив Посольский сор	<u>0,90-3,70</u> 2,28 ±0,90	<u>0,06-3,60</u> 1,73 ±1,26	<u>0,01-100,00</u> 15,62 ±37,45
Залив Сор Черкалов	<u>1,90-2,10</u> 2,00 ±0,14	<u>1,80-2,00</u> 1,90 ±0,14	<u>0,01-100,00</u> 55,05 ±70,64
Боярск, фон	<u>0,80-5,20</u> 2,20 ±1,25	<u>0,05-2,3</u> 1,2 ±0,9	<u>0,01-1,00</u> 0,21 ±0,39
Энхалук, фон	<u>2,00-2,10</u> 2,05 ±0,07	<u>0,18-0,60</u> 0,39 ±0,30	0,1

В числителе – минимальные и максимальные значения, в знаменателе – средние значения

Средние значения ОЧМ в воде заливов и фоновых участков побережья Байкала также были сопоставимы – 0,95-1,29 млрд кл/мл (табл. 4). Количество сапрофитных и целлюлозоразлагающих бактерий в осадках заливов было повышенным по сравнению с фоновыми участками, как и в водном микробном сообществе. В ряду осадков «песок - заиленный песок – ил» содержание органического углерода, общая численность бактерий и численность сапрофитных бактерий увеличивались.

В исследованных участках озера Байкал постоянным и закономерным компонентом микробного звена являются сапрофитные бактерии. Количественные значения численности сапрофитов и в воде, и в осадках заливов составили величины одного порядка (10^5 - 10^6), хотя значения ОЧМ в воде были на 2-3 порядка меньше, чем в осадках. Доля сапрофитных бактерий в воде достигала 98%, в осадках – 0,17%. Повидимому, значительная доля сапрофитных бактерий в воде по сравнению с осадками обусловлена наличием легкоусвояемого органического вещества, которое не успевает захорониться в осадках и в большей степени используется водными микроорганизмами.

Таблица 4

Численность бактерий в прибрежных осадках соров и
контрольных участков озера Байкал

Место отбора	$S_{орг}$, %	ОЧМ, млрд. кл/мл	Численность сапрофитных бактерий, млн. кл/мл	Численность целлюлозо- разлагающих бактерий, тыс. кл/мл
Залив Провал	$\frac{0,03-7,32}{1,20 \pm 2,04}$	$\frac{0,40-2,70}{1,05 \pm 0,76}$	$\frac{0,12-3,40}{1,97 \pm 1,05}$	$\frac{0,01-1,00}{0,24 \pm 0,38}$
Залив Посольский сор	$\frac{0,27-0,98}{0,36 \pm 0,30}$	$\frac{0,43-2,60}{1,29 \pm 0,83}$	$\frac{0,14-2,20}{0,76 \pm 0,79}$	0,01
Залив Сор Черкалов	$\frac{1,00}{0,50 \pm 0,71}$	$\frac{0,57-1,90}{1,24 \pm 0,95}$	$\frac{1,30-3,30}{2,30 \pm 1,41}$	1,00
Боярск, фон	$\frac{0,1-0,2}{0,15 \pm 0,71}$	$\frac{0,41-2,40}{0,95 \pm 0,68}$	$\frac{0,05-1,10}{0,23 \pm 0,34}$	0,01
Энхалук, фон	$\frac{0,24-0,34}{0,29 \pm 0,07}$	$\frac{0,68-1,40}{1,04 \pm 0,51}$	$\frac{0,25-1,10}{0,68 \pm 0,60}$	0,01

В числителе – минимальные и максимальные значения, в знаменателе – средние значения

3.3. Процессы продукции и деструкции органического вещества в мелководных заливах озера Байкал

Продукция и деструкция в прибрежной воде заливов и контрольных участков были одного порядка – 48,8 и 59,0 мг С/дм³ в сутки и 32,2 и 47,6 мг С/дм³ в сутки, соответственно (табл. 5). Вклад оксигенного фотосинтеза в продукцию был наибольшим (72%), темновая ассимиляция СО₂ составляла 5%. Фотосинтез в заливе Провал отличался большей интенсивностью по сравнению с другими изученными мелководными заливами. Полученные данные позволяют говорить о том, что процессы продукции и деструкции в прибрежье заливов сбалансированы, небольшое преобладание процессов деструкции можно объяснить дополнительным поступлением аллохтонного органического вещества в мелководье. Сбалансированность процессов продукции и деструкции в мелководных заливах отмечалась ранее (Кулагин, Помазкина, 1977). Следует отметить, приведенные в этой работе данные были выше полученных нами, что позволило авторам отнести мелководные заливы озера Байкал к мезотрофным водоемам.

В осадках деструкция протекала как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Величины аэробной и анаэробной деструкции в осадках были сопоставимы, с небольшим преобладанием аэробного

процесса. Максимальные значения всех процессов выявлены в заливе Сор-Черкалов.

Таблица 5

Средние значения продукции и деструкции в воде и осадках озера Байкал

Местоположение	Вода		Осадки	
	Продукция, мг С/дм ³ в сутки	Деструкция, мг С/дм ³ в сутки	Аэробная деструкция, мг С/ м ² в сутки	Анаэробная деструкция, мг С/ м ² в сутки
Мелководные заливы				
Залив Провал	45,7±44,9	54,5±35,6	49,7±133,3	49,5±16,7
Залив Посольский Сор	29,8±41,6	46,6±39,5	63,0±75,9	41,7±13,2
Залив Сор Черкалов	70,8±1,6	76,0±5,65	146,2±147,5	132,2±15,8
Среднее	48,8±20,7	59,0±15,2	86,3±52,3	74,5±50,2
Контрольные участки				
Боярск, фон	23,12±32,4	55,1±29,7	117,4±334,5	67,2±38,3
Энхалук, фон	41,2±43,5	40,0±45,2	43,8±1,3	42,5±1,1
Среднее	32,2±12,8	47,6±10,7	80,6±52,0	40,4±3,0

3.4. Сезонная динамика развития микробного сообщества в заливе Провал озера Байкал

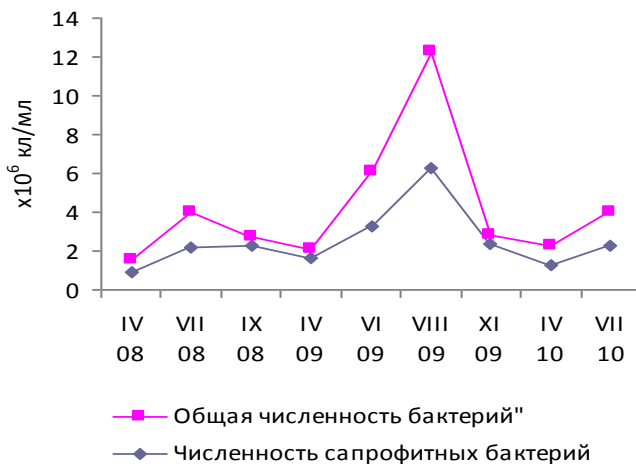
Сезонные колебания условий среды обитания оказывают влияние на состояние микробных сообществ (Кузнецов, 1970; Кожов, 1972).

В воде и осадках залива Провал сезонные изменения численности микроорганизмов происходили в пределах одного порядка (рис 1). Максимальные значения общей численности и численности сапрофитных бактерий приурочены к летним месяцам (июнь - август). Возникновению максимума в августе способствует обогащение органическим веществом отмирающего летнего комплекса фитопланктона. В целом, сезонная динамика численности сапрофитных бактерий совпадала с динамикой общей численности микроорганизмов. В сезонной динамике ОЧМ и численности сапрофитов в осадках наблюдали такую же закономерность, как и в воде. Максимальные значения отмечены в июне и в августе, в это же время выявлены наибольшие показатели содержания органического вещества в осадках. Максимумом с соавторами в Байкале определено два пика численности бактерий – поздне-весенний и летне-осенний (Максимова, Максимов, 1989; Максимова и др., 1991).

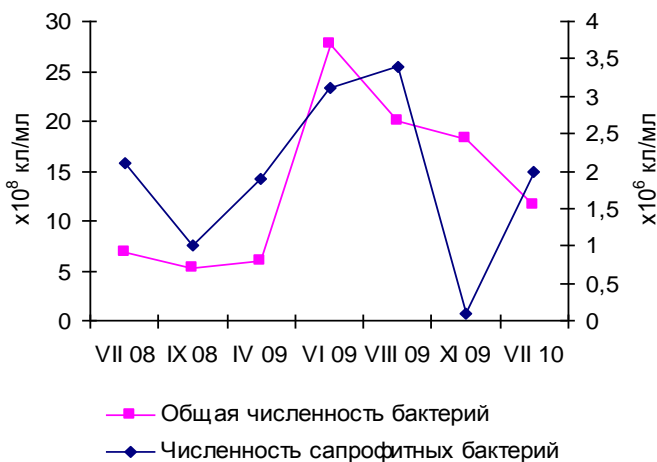
Сезонные изменения продукции и деструкции органического вещества в воде представлены на рисунке 2. Зафиксированы два пика скорости процесса продукции - в июле и в ноябре. Максимальные скорости деструкции наблюдались в июле. Следует отметить, что графики

сезонной динамики продукционного и деструкционного процессов находились в противофазе.

Полученные результаты показывают, что летне-осенний период развития микробного сообщества залива Провал озера Байкал характеризуется высокими значениями численности и активной деятельностью микроорганизмов.



А



Б

Рисунок 1. Сезонная динамика численности микроорганизмов в заливе Провал озера Байкал: А - вода, Б – осадки

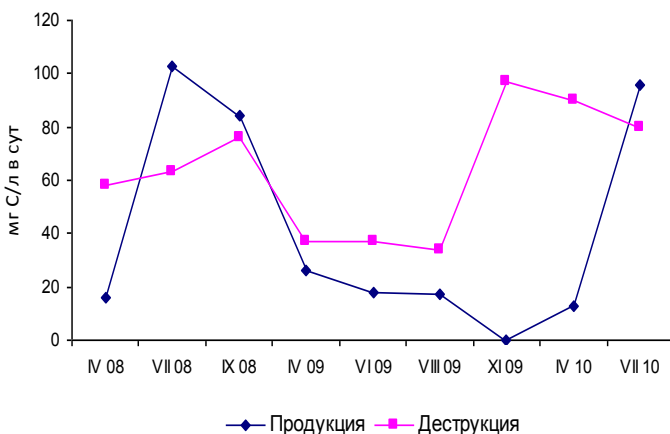


Рисунок 2. Сезонная динамика продукции и деструкции органического вещества в воде залива Провал озера Байкал

3.5. Характеристика разнообразия микробных сообществ молекулярно-генетическими методами

Для изучения природных микробных сообществ мелководных заливов озера Байкал использовали разные методические подходы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР): доминирующие генотипы получены с помощью ПЦР и клонирования, структуру микробных сообществ проанализировали методом ПЦР в реальном времени и групп-специфичной ПЦР, состав микробного сообщества оценили методом пиросеквенирования ампликона. Идентификация культивируемых сапрофитных бактерий проведена на основе анализа полноразмерного гена 16S рРНК.

Групп-специфичная амплификация тотальной ДНК, выделенной из прибрежных осадков мелководных заливов и фоновых участков, проведена как на два домена прокариот Archaea и Bacteria, так и крупные бактериальные филумы: Proteobacteria (классы Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria), Actinobacteria, Firmicutes, Planctomycetes, Bacteroidetes и Cyanobacteria. За исключением фонового участка Энхалук, в осадках всех остальных станций детектирован одинаковый спектр ампликонов, что показывает широкую распространенность исследованных групп микроорганизмов, как в мелководных заливах, так и в фоновых участках.

ПЦР в реальном времени позволила установить, что в водном микробном сообществе наиболее представлены такие таксоны бактерий,

как Betaproteobacteria и Cyanobacteria. Это согласуется с данными Л.Я. Денисовой с соавторами (Денисова и др., 1999), отмечающих наличие в разных слоях водной толщи озера протеобактерий и цианобактерий. В мелководном заливе было выявлено преобладание класса Betaproteobacteria, в то время как в фоновом участке доминировали представители филума Cyanobacteria. Представители групп Alphaproteobacteria, Planctomycetes и домена Archaea отмечены как минорные компоненты.

Клонированием фрагмента гена 16S рРНК в прибрежных осадках в качестве доминирующих определены представители пяти групп эубактерий: филумов Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Acidobacteria и домена Archaea (рис. 3). Наиболее широко представлен филум Proteobacteria (35%). Среди протеобактерий большая часть последовательностей относена к классу Betaproteobacteria, что также хорошо согласуется с полученными нами данными по групп-специфичной ПЦР и ПЦР в реальном времени.

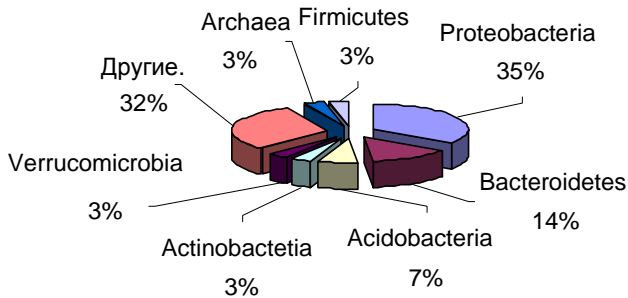
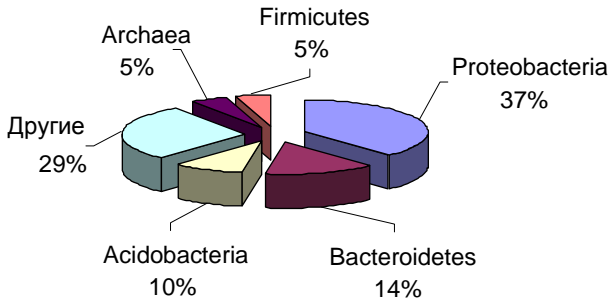


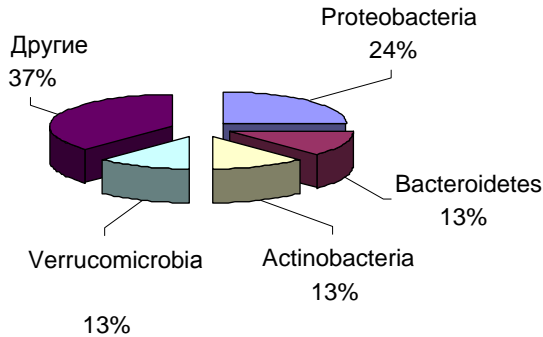
Рисунок 3. Филогенетическое разнообразие прокариот в исследованных прибрежных осадках мелководных и фоновых участков озера Байкал

Сравнительный анализ показал, что нуклеотидные последовательности преимущественно имеют невысокий процент гомологии с последовательностями из EMBL банка данных. Возможно, полученные последовательности принадлежат к новым видам, свойственным экосистеме озера Байкал. Нуклеотидные последовательности имели наибольшую гомологию с последовательностями некультивируемых микроорганизмов (83-98% сходства), которые регистрировались в осадках других пресных водоемов и почвенных экосистемах. Сходство с последовательностями культивируемых микроорганизмов в целом было ниже - от 74%.

Состав микробного сообщества мелководных заливов и фоновых участков имеет небольшие различия. Несмотря на то, что в осадках заливов, также как и контрольных участков, доминируют микроорганизмы с неопределенным таксономическим положением и высока доля представителей филумов Proteobacteria и Bacteroidetes (рис. 4), в мелководных заливах идентифицированы дополнительно Archaea и Acidobacteria (рис. 4, А), а в открытом Байкале - Actinobacteria и Verrucomicrobia (рис. 4, Б).



А



Б

Рисунок 4. Филогенетическое разнообразие прокариот в осадках озера Байкал

(А – мелководные заливы, Б – фоновые участки)

В результате пиросеквенирования ампликона с суммарной ДНК, выделенной из осадков залива Провал озера Байкал, определено 6987 нуклеотидных последовательностей, принадлежащих домену Bacteria и объединенных в 2614 операционные таксономические единицы (OTU) на видовом уровне, что характеризует большое бактериальное разнообразие. Всего в исследованном микробном сообществе обнаружен 41 крупный таксон. Наибольшая доля в сообществе принадлежит филуму Proteobacteria (45%), что согласуется с результатами клонирования и групп-специфичной ПЦР. Внутри филума Proteobacteria преобладает класс Betaproteobacteria (45% от числа всех протеобактерий). Доминирование этого класса в заливе Провал также было показано с помощью ПЦР в реальном времени. Доля остальных классов Alpha-, Gamma- и Deltaproteobacteria составила 17%, 26% и 12%, соответственно. Также весомую долю в сообществе имеют представители филумов Actinobacteria (14%), Acidobacteria (12%), Bacteroidetes (7%), Chloroflexi (7%), Planctomycetes (3%) и Nitrospirae (1%) (рис. 5). Другие, не столь многочисленные филумы, составили в сумме 11%.

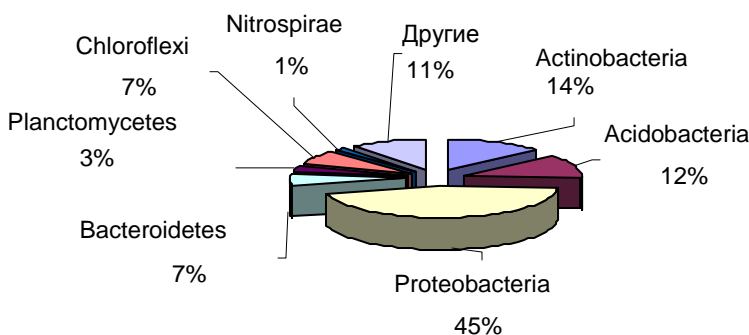


Рисунок 5. Филогенетическое разнообразие прокариот в осадках залива Провал озера Байкал, полученное по результатам пиросеквенирования ампликона гена 16S рРНК

Следует отметить, что среди большого бактериального разнообразия на различных таксономических уровнях разными молекулярно-генетическими методами выявлена высокая доля последовательностей бактерий с неясным таксономическим положением, относящихся к некультивируемым формам. Только на уровне основных филумов бактерий их фракция составила 45%. На уровне вида количество таких последовательностей было подавляющим. Можно заключить, что на представительной выборке анализируемых последовательностей

подтверждено, что среди байкальских микроорганизмов доминируют некультивируемые формы бактерий с низким процентом гомологии с ближайшими родственниками, что может предполагать их эндемичность. Это согласуется с нашими данными, полученными с помощью клонирования, а также с литературными данными (Белькова, 2004; Шубенкова и др., 2005; Земская, 2007; Черницына и др., 2007).

Таким образом, проведена оценка разнообразия микробного сообщества в прибрежных осадках мелководных заливов, а также фоновых участках различными методами. Полученные результаты устанавливают доминирование в микробном сообществе 4 филумов бактерий: Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria и Acidobacteria. Среди них большая доля принадлежит филуму Proteobacteria, классу Betaproteobacteria. Сравнение полученных результатов с литературными данными показало сопоставимость микробного разнообразия мелководных участков со структурой сообществ ранее изученных экотопов озера Байкал – водной толщи, глубоководных осадков, в том числе и из районов разгрузки газов, приустьевых участков дельты Селенги, биопленок, где также наиболее широко представлен филум Proteobacteria.

3.6. Молекулярно-генетическая идентификация культивируемых сапрофитных микроорганизмов

Как установлено, в водной экосистеме мелководных заливов озера Байкал важным компонентом являются сапрофитные бактерии. Из воды исследованных участков изолировали в чистую культуру численно доминировавшие при посеве природного образца на твердые питательные среды колонии. Всего получено 14 чистых культур. Для анализа гена 16S рРНК было выбрано 8 морфологически различающихся культур. Нуклеотидные последовательности зарегистрированы в международном банке данных, проведен их сравнительный (табл. 6) и филогенетический анализ.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей с ближайшими гомологами показал, что они являются представителями классов Actinobacteria и Gammaproteobacteria. Исследуемые штаммы могут быть отнесены к родам *Brevibacterium* (4 штамма), *Pseudomonas* (2 штамма), *Aeromicrobium* (1 штамм) и *Agrococcus* (1 штамм).

Высокий процент гомологии с ближайшими родственниками актинобактерий и филогенетический анализ с типовыми штаммами соответствующих родов позволяет идентифицировать штаммы LBPr24, LBPr25, LBChiv2, LBPr6 как *Brevibacterium casei*.

Таблица 6.

Результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей чистых культур сапрофитных бактерий, выделенных из мелководных заливов озера Байкал

№ (п.н.)	Номер в банке данных	Ближайший родственник, гомология	Филум/класс, семейство
LBPr24 (1090)	HE617663	<i>Brevibacterium</i> sp., 97%	Actinobacteria, Brevibacteriaceae
LBPr25 (1447)	HE617664	<i>Brevibacterium</i> sp., 99%	Actinobacteria, Brevibacteriaceae
LBB2 (1423)	HE617665	<i>Agrococcus</i> sp., 99%	Actinobacteria, Microbacteriaceae
LBChiv2 (1441)	HE617666	<i>Brevibacterium</i> sp., 99%	Actinobacteria, Brevibacteriaceae
LBIst (1434)	HE617667	<i>Aeromicrobium</i> sp., 96%	Actinobacteria, Nocardioidaceae
LBPr5 (886)	HE617668	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , 95%	Gammaproteobacteria, Pseudomonadaceae
LBPr6 (1443)	HE617669	<i>Brevibacterium casei</i> , 99%	Actinobacteria, Brevibacteriaceae
LBPS2 (1451)	HE617670	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , 98%	Gammaproteobacteria, Pseudomonadaceae

Штамм LBIst может быть отнесен к виду *Aeromicrobium flavum* благодаря высокому уровню бутстреп поддержки кластеризации с типовым штаммом. Штамм LBB2 на основании филогенетического анализа попадает в один кластер с видами *Agrococcus jenensis* DSM 9580^T (X92492) и *Agrococcus citreus* IAM 15145^T (AB279547). Однако высокий процент гомологии только с последовательностями неидентифицированных штаммов, невысокая бутстреп поддержка кластеризации и наличие только двух зарегистрированных последовательностей этих видов не позволяют идентифицировать этот штамм до вида. Таким образом, анализ разнообразия культивируемых сапрофитных бактерий показал, что среди сапрофитных бактерий чаще всего культивируются представители широко распространенных родов.

3.7. Анализ массивов многомерных данных физико-химических и микробиологических показателей мелководных заливов озера Байкал

Методом главных компонент (РСА) были проанализированы данные по функциональной активности микробного сообщества воды и осадков мелководных заливов озера Байкал, что позволило выявить наиболее важные факторы, влияющие на функционирование микробного

сообщества экосистемы.

В анализе состояния экосистемы воды первая главная компонента (PC1) объясняет 41,2% наблюдаемых изменений и включает в себя процессы продукции и деструкции органического вещества и содержание гидрокарбонатов. Вторая по значимости компонента PC2 объясняет 27,8% изменений системы и зависит от минерализации, содержания гидрокарбонатов и, в меньшей степени, от температуры. На графике нагрузок (рис. 6) можно отметить тесную взаимосвязь факторов минерализации и содержания карбонатов. Таким образом, установлено, что в воде мелководных заливов озера Байкал наибольшее значение для функционирования экосистемы имеют процессы продукции и деструкции органического вещества.

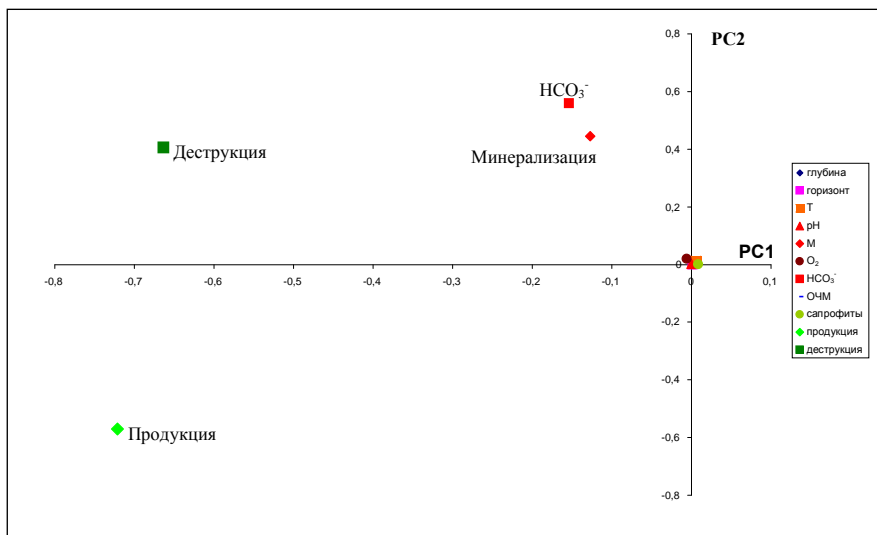


Рисунок 6. Распределение факторов, влияющих на экосистему микробного сообщества воды в пространстве PC1-PC2 (график нагрузок)

На графике нагрузок, описывающем экосистему осадков (рис. 7) видно, что в осадках изученных участков озера ОЧМ определяет экологическое состояние экосистемы (48% наблюдаемых изменений), в зависимости от которой находятся все остальные исследованные факторы. В осадках параметр ОЧМ играет важную роль в изменениях экосистемы, в отличие от численности микроорганизмов в воде заливов. Аэробная деструкция, преобладающая над анаэробной деструкцией, в наблюдаемых изменениях экосистем мелководных заливов также оказывает весомое влияние (31%). В осадках мелководных заливов микробное сообщество,

осуществляющее деструкцию, выступает активным регулятором параметров экосистемы мелководных заливов озера Байкал.

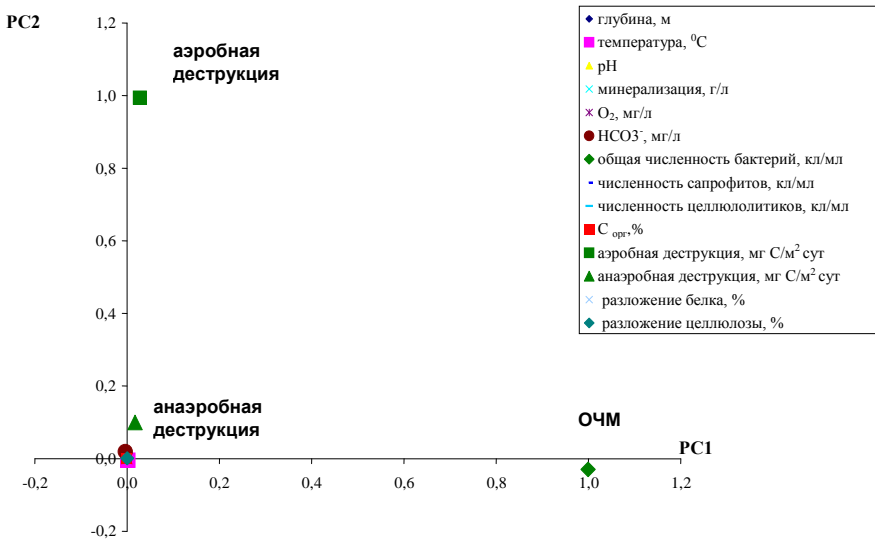


Рисунок 7. Распределение факторов, влияющих на экосистему микробного сообщества осадков в пространстве PC1-PC2 (график нагрузок)

Таким образом, метод главных компонент позволил проанализировать значительный массив представленных данных и выявить главные компоненты, которые играют важную роль в исследованных участках озера Байкал. Результаты показали успешность применения этого метода для анализа большой выборки полученных данных с разными размерностями и установили его перспективность в обработке подобных массивов и наглядной оценке состояния экосистем. Главными факторами, влияющими на экосистему воды мелководья озера Байкал, являются процессы продукции и деструкции органического вещества, а также минерализация. В экосистеме осадков деструкционное звено микробного сообщества имеет определяющее значение – главными компонентами, влияющими на функционирование осадков, являются численность микроорганизмов и аэробная деструкция.

ВЫВОДЫ

1. Мелководные заливы характеризуются более высокой численностью микроорганизмов, чем фоновые прибрежные участки открытого Байкала. В воде заливов доминируют сапрофитные бактерии, что показывает их активную роль в трансформации автохтонных и аллохтонных веществ придельтовой территории реки Селенга.
2. Процессы продукции и деструкции в прибрежной воде заливов сбалансированы. Максимальные значения превышали аналогичные в фоновых участках. В осадках деструкция протекала как в аэробных, так и в анаэробных условиях, аэробная деструкция превалировала.
3. Сезонные колебания численности бактерий и в воде, и в осадках происходят в пределах одного порядка величин. Максимальные значения общей численности бактерий и сапрофитных бактерий были приурочены к летним месяцам. Пики деструкции, в целом, совпадали с пиками численности гетеротрофов.
4. Оценка разнообразия микроорганизмов мелководных заливов и фоновых участков различными методами показала, что бактериальное сообщество характеризуется большим разнообразием. В микробном сообществе доминируют представители филума Proteobacteria, субдоминантами являются представители филумов Bacteroidetes, Actinobacteria и Acidobacteria.
5. В осадках мелководных заливов озера Байкал доминируют микроорганизмы, имеющие наибольшее сходство с некультивируемыми формами с неопределенным таксономическим положением, что, возможно, предполагает их эндемичность.
6. Многофакторный анализ массивов данных показал, что главными факторами, влияющими на экосистему воды мелководья, являются процессы продукции и деструкции органического вещества, а также минерализация. В экосистеме осадков микробное сообщество имеет определяющее значение – главными компонентами, влияющими на функционирование осадков, являются численность микроорганизмов и активность микроорганизмов деструкционного звена.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Распространение и численность микроорганизмов в грунтах залива Посольский Сор озера Байкал // Вестник Бурятского госуниверситета. Серия «Биология, география». Вып. 4. 2008. С. 71-72.
2. Намсараев Б.Б., Дагурова О.П., Бурюхаев С.П., **Гаранкина В.П.** Гидрохимическая характеристика заливов восточной части озера Байкал // Вестник Бурятского госуниверситета. Серия «Химия, физика». Вып. 3. 2008. С. 38-40.
3. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П., Дамбаев В.Б., Бурюхаев С.П. Распространение и активность микроорганизмов в заливе Провал озера Байкал. // Вестник Бурятского госуниверситета. Серия «Биология. География». Вып. 4. 2009. С. 84-88.
4. **Гаранкина В.П.**, Дамбаев В.Б., Бурюхаев С.П. Изотопный состав углерода органического вещества донных осадков озера Байкал // Вестник Бурятского госуниверситета. Серия «Химия. Физика». Вып. 3. 2009. С. 14-17.
5. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Деструкция органического вещества в прибрежной зоне залива Посольский Сор оз. Байкал // Известия Иркутского госуниверситета. Т.2. №2. Серия «Науки о Земле». 2009. С. 65-71.
6. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Микробные процессы в заливе Провал озера Байкал // Вестник Бурятского госуниверситета. Серия «Химия. Физика». Вып. 3. 2010. С.24 - 28.
7. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П., Намсараев Б.Б. Сравнительная характеристика численности бактерий в глубоководных осадках и мелководных грунтах озера Байкал // Вестник Бурятского госуниверситета. Серия «Биология. География». Вып. 4. 2010. С.87-91.

Тезисы

8. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Численность микроорганизмов в воде залива Провал озера Байкал // Актуальные аспекты современной микробиологии: IV молодежная школа-конференция с международным участием. Тезисы докладов. М: «МАКС Пресс», 2008. С. 12.
9. **Гаранкина В.П.** Продукция и деструкция органического вещества в мелководных заливах озера Байкал // Экология Сибири и сопредельных территорий. Вып. 12. Т. 1. Абакан: Изд-во Хакасского госуниверситета им. Н.Ф. Катанова, 2008. С. 126-127.
10. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Продукция и деструкция органического вещества в воде мелководных заливов озера Байкал // « Биология – наука XXI века»: XIII международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Тезисы докладов. Пушино, 2009. С. 195-196.
11. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Разложения белка и целлюлозы в прибрежных осадках мелководных заливов озера Байкал // «Современные проблемы микробиологии Центральной Азии»: Всеросс. конф. с международ. участием. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского госуниверситета, 2010. С. 59-63.

12. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Численность сапрофитных бактерий в прибрежно-соровой зоне озера Байкал // «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы»: материалы Всероссийской конференции молодых ученых. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского госуниверситета, 2010. С.26-28.
13. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П., Дамбаев В.Б. Функционирование микробного сообщества в сорах озера Байкал // Тез. докл. V Верещагинской Байкальской конференции. Иркутск: Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2010. С. 130-131.
14. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П., Суханова Е.В., Белькова Н.Л. Разнообразие микробного сообщества в мелководных заливах озера Байкал // Материалы II межд. науч. конф. «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии». Улан-Удэ: Изд-во Бурятского научного центра СО РАН, 2011. С. 156.
15. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П. Сезонная динамика развития микробного сообщества залива Провал (оз. Байкал) // Материалы межд. конф. «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний». Улан-Удэ: Издательство Бурятского госуниверситета, 2011. С. 48-49.
16. **Гаранкина В.П.**, Дагурова О.П., Намсараев Б.Б. Распространение микроорганизмов в мелководных заливах озера Байкал // Материалы 3 Байкальского Микробиологического Симпозиума с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах». Иркутск: Изд-во Иркутского госуниверситета, 2011. С. 36-37.