

На правах рукописи

МИХАЙЛОВ Иван Сергеевич

**АЛЬГО-БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СООБЩЕСТВА
ЭПИЛИМНИОНА ОЗЕРА БАЙКАЛ**

03.02.08 – Экология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск, 2015

Работа выполнена в отделе ультраструктуры клетки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск.

Научный
руководитель:

кандидат биологических наук,
Захарова Юлия Робертовна

Официальные
оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ,
Кондратьева Любовь Михайловна
Институт водных и экологических проблем ДВО
РАН, г. Хабаровск

доктор биологических наук,
Маркова Юлия Александровна
Сибирский институт физиологии и биохимии
растений СО РАН, г. Иркутск

Ведущая
организация:

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования «Дальневосточный
федеральный университет», г. Владивосток

Защита диссертации состоится 24 декабря 2015 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 666003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М.М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 24, и на сайте ИГУ http://isu.ru/filearchive/dissert/disser_Mikhailov.pdf.

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет. Тел./факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.

Автореферат разослан _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н., доцент

А.А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Одноклеточные водоросли и бактерии – важнейшие участники биогеохимических циклов в большинстве водных экосистем. Взаимодействия между первичными продуцентами и бактериями влияют на физиологию этих организмов, приводят к изменению условий окружающей их среды и участвуют в формировании разнообразия экосистемы (Amin *et al.*, 2015).

Озеро Байкал – крупнейшее и самое глубокое пресноводное озеро в мире. Эпилимнион – верхний, наиболее интенсивно перемешиваемый слой озера, в котором массово развивается фитопланктон, представленный в весенне-летний период диатомовыми водорослями (13–98 % биомассы фитопланктона в пелагиали озера) (Popovskaya *et al.*, 2006). Растворенные органические вещества, продуцируемые микроводорослями, усваиваются в основном гетеротрофными бактериями, поэтому изменение количественных и качественных характеристик фитопланктона влияет на численность и видовой состав бактерий (Teeling *et al.*, 2012; Buchan *et al.*, 2014). Микроорганизмы эпилимниона озера Байкал ранее определяли с помощью традиционных методов микроскопии (Антипова, 1963; Popovskaya *et al.*, 2006), культивирования (Парфенова, Илялетдинов 1985; Павлова и др., 2003; Парфенова и др., 2006) и анализа последовательностей генов 16S рРНК (Денисова и др., 1999; Белькова и др., 2003; Glöckner *et al.*, 2000) и 18S рРНК (Анненкова и др., 2009; Belykh *et al.*, 2000; Fietz *et al.*, 2005). В этих работах использованы методы, с помощью которых в отдельной пробе можно идентифицировать несколько десятков видов микроорганизмов, однако природные сообщества могут содержать сотни и тысячи видов. Применение технологий массового параллельного секвенирования позволяет выявить не только доминирующих, но и минорных представителей сообществ бактерий и одноклеточных эукариот, что способствует наиболее полной характеристике биоразнообразия, которое обеспечивает сохранение стабильности экосистемы (Andersson *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2013). Бактерии и микроводоросли сосуществуют в одной среде, но насколько тесные взаимодействия между ними и зависит ли таксономический состав этих групп про- и эукариот друг от друга в озере Байкал не известно.

Цель работы – определить структуру и разнообразие альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал в весенне-летний период и исследовать особенности взаимодействий диатомовых водорослей и бактерий.

Задачи исследования:

1. Исследовать альго-бактериальные сообщества в эпилимнионе озера Байкал с помощью световой, сканирующей электронной микроскопии и методов культивирования.

2. Определить структуру сообществ бактерий и одноклеточных эукариот эпилимниона озера Байкал и провести сравнение разнообразия сообществ из различных районов озера на основе данных пиросеквенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК.

3. Определить таксономический состав бактерий, развивающихся в лабораторных условиях совместно с диатомовыми водорослями, изолированными из озера Байкал.

4. Подобрать условия получения аксеничной (безбактериальной) культуры планктонной диатомовой водоросли *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabitshevsky.

Научная новизна работы. Впервые проведен комплексный анализ альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал в весенне-летний период с помощью пиросеквенирования ампликонов фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК, световой и сканирующей электронной микроскопии. Установлено, что в эпилимнионе различных районов озера развиваются сходные по структуре бактериальные сообщества, несмотря на существенные различия в составе фитопланктона. С помощью анализа фрагментов генов 18S рРНК в эпилимнионе озера Байкал впервые определены представители Chytridiomycota, которые, как известно, являются паразитами фитопланктона и сапротрофами (Kagami *et al.*, 2007). Показаны альго-бактериальные ассоциации в эпилимнионе озера Байкал и в лабораторных культурах диатомовых водорослей. В культурах планктонных диатомей из Байкала идентифицированы бактерии, принадлежащие филумам *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*. Впервые получена аксеничная культура планктонной диатомовой водоросли *S. acus* subsp. *radians*.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Результаты исследований позволили расширить представления о структуре комплексных сообществ бактерий и одноклеточных эукариот в различных

местообитаниях эпилимниона озера Байкал. Свыше 40 тыс. последовательностей 16S рРНК бактерий и 260 тыс. последовательностей 18S рРНК одноклеточных эукариот были получены в результате пиросеквенирования и внесены в мировую базу данных NCBI, что имеет практическое значение для сравнительного анализа микроорганизмов из различных водных экосистем. Апробированный в работе метод пиросеквенирования может быть использован для мониторинга состава сообществ бактерий и одноклеточных эукариот в озере Байкал. Разработанная методика получения аксеничных культур диатомовых водорослей, была применена для различных микроводорослей в других лабораториях мира (Amin *et al.*, 2015). Аксеничная культура диатомеи *S. acus* subsp. *radians* используется в цитологических и полногеномных исследованиях (Петрова и др., 2013; Галачянц и др., 2015).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Альго-бактериальные сообщества эпилимниона озера Байкал в весенне-летний период характеризуются высоким разнообразием.
2. Бактериальные сообщества в различных районах эпилимниона озера Байкал, отличающихся видовым составом фитопланктона, имеют сходную структуру.
3. Получение безбактериальной культуры планктонной диатомовой водоросли *S. acus* subsp. *radians*.

Апробация работы: Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на Верещагинских Байкальских конференциях (Иркутск, 2010, 2015), Байкальских Микробиологических симпозиумах с международным участием (Иркутск, 2011, 2015), XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2013» (Москва, 2013), VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013).

Личный вклад автора. Диссертационная работа является результатом исследований автора. Фактические данные получены автором лично при его участии в экспедиционных и лабораторных работах, включая анализ и обобщение полученных результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них 3 статьи в рецензируемых (Web of Science) журналах и 8 материалов отечественных и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы и 4 приложений. Работа изложена на 153 страницах, содержит 4 таблицы и 41 рисунок. Список литературы включает 63 отечественных источников и 186 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Ю.Р. Захаровой и д.б.н., проф. Е.В. Лихошвай за всестороннюю помощь в работе, к.б.н. С.М. Шишлянникову в получении аксеничной культуры *S. acus* subsp. *radians* и ее миксотрофном культивировании, к.б.н. Ю.П. Галачьянцу и М.В. Башенхаевой – в анализе данных пироксвенирования, к.б.н. Д.П. Петровой – в освоении молекулярно-биологических методов, Н.А. Волокитиной – в культивировании диатомовых водорослей, к.б.н. И.В. Клименкову и к.б.н. Е.Д. Бедошвили – в работе с ТЭМ, к.х.н. А. Г. Горшкову – в анализе метиловых эфиров жирных кислот; за предоставление материалов комплексных кругобайкальских экспедиций: д.б.н. Г.И. Поповской, к.б.н. М.В. Усольцевой, к.г.н. В.М. Домышевой, к.г.н. М.В. Сакирко, Р.Ю. Гнатовскому и к.г.н. В.В. Блинову и всем сотрудникам отдела ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН за поддержку при выполнении работ и участие в обсуждении результатов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведено описание экологических условий в эпилимнионе озера Байкал, общая характеристика диатомовых водорослей, гетеротрофных бактерий и их взаимодействий в водных экосистемах. Проведен анализ данных литературы по ассоциациям диатомей и бактерий в лабораторных условиях.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования были альго-бактериальные сообщества в эпилимнионе озера Байкал. Пробы планктона отбирали с бортов НИС «Верещагин» и «Академик Коптюг» в конце мая – начале июня 2011–2013 гг. с помощью системы батометров SBE-32 (Carousel Water Sampler, фирмы Sea-Bird Electronics, Inc., США) и сетью Джели с глубин 0 м, 5 м, 10 м, 15 м, 20 м, 25 м на 30 станциях озера Байкал (рис. 1). Для СЭМ пробы фитопланктона фиксировали глутаровым альдегидом, осаждали на поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, Ирландия) и обезвоживали в серии растворов этанола 30 %, 50 %, 70 %, 96 % и высушивали.

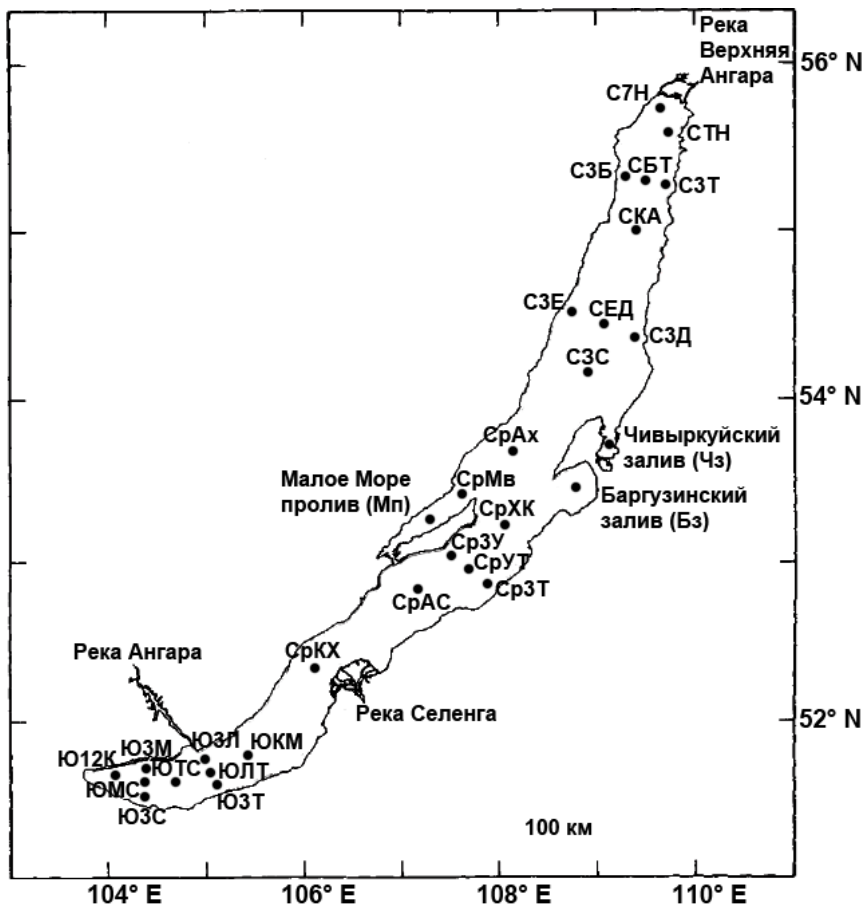


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб.

Образцы помещали на столики, напыляли золотом в вакуумной установке SDC 004 (Balzers, Лихтенштейн) и исследовали с помощью SEM 525-M (Philips, Голландия) и Quanta 200 (FEI Company, США). Для культивирования диатомеи изолировали из фитопланктона Байкала. Единичные клетки диатомей с помощью микропипетки

переносили в отдельные лунки 96-луночного планшета (Linbro Biomedicals, INC, Дания), содержащие 200 мкл среды DM (Thompson *et al.*, 1988). Клетки выращивали в миниинкубаторе при 10 °С и освещении 16 мкЭ/м²с с чередованием дня и ночи 12:12 (по Safonova *et al.*, 2007). При достижении численности диатомей в лунке 10³ клеток, моноклональные культуры переносили в колбы Эрленмейера со средой DM. Культивирование гетеротрофных бактерий проводили на рыбо-пептонном агаре, разбавленном в 10 раз (РПА/10) (по Горбенко и др., 1992) и агаре с гидролизатом диатомовых водорослей (по Захарова и др., 2010). ДНК из образцов выделяли с помощью лизоцима и ДДС-Na (Zakharova *et al.*, 2013). Амплификацию фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК проводили в амплификаторе “БИС” М-111 (БИС-Н, Новосибирск). Для определения бактерий в культурах диатомей ампликоны, полученные с праймерами EUB27L, 500L – 1350R, лигировали в вектор pJET (CloneJET™ PCR CloningKit, Литва), который трансформировали в компетентные клетки *E. coli* (штаммы DH5αF и XL-1) (Inoue *et al.*, 1990). Фрагменты гена 16S рРНК секвенировали в ABI 3130XL Genetic Analyser в ЦКП «Геномика» (Новосибирск). Анализ полученных нуклеотидных

фрагментов проводили путем поиска гомологичных последовательностей в базе данных GenBank с помощью программы BLASTN. Филогенетический анализ фрагментов генов 16S рРНК проводили с помощью программы MEGA5.1. Для определения состава бактериальных и эукариотических сообществ эпилимниона Байкала из природных проб выделена суммарная ДНК и проведена амплификация фрагментов генов 16S рРНК с праймерами U341F и U785R, фрагментов генов 18S рРНК с праймерами F и R (Nolte *et al.*, 2010). Пиросеквенирование ампликонов фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК проводили на платформе GS FLX 454 (Roche, США), полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Mothur 1.19.0 (Schloss *et al.*, 2009). Полученные последовательности фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК зарегистрированы в NCBI Short Read Archive с номерами SRAid: SRR1806738 и SRAid: SRR2027823 соответственно. Для сообществ бактерий и одноклеточных эукариот оценивали богатство – количество операционных таксономических единиц (ОТЕ) и разнообразие – индекс Шэннона. Сравнение сообществ из различных районов озера проводили с помощью метода главных компонент (МГК) на основе индекса Брея-Кертиса. Для сравнительной оценки ОТЕ и количества, принадлежащих им последовательностей в различных образцах использовали диаграммы Венна. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам (Гланц, 1998) с использованием программного пакета Microsoft Excel 7.0 для Windows 7.

ГЛАВА 3. Среда обитания альго-бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал

Для характеристики физико-химических условий и фитопланктона в эпилимнионе озера Байкал в период наших исследований в 2011-2013 гг. были использованы данные, полученные в ходе совместных комплексных экспедиций по озеру Байкал. Данные по температуре предоставлены сотрудниками Лаборатории гидрологии и гидрофизики ЛИН СО РАН – Р.Ю. Гнатовским и к.г.н. В.В. Блиновым; данные по рН, концентрациям кислорода и биогенных элементов – сотрудниками Лаборатории гидрохимии и химии атмосферы ЛИН СО РАН – к.г.н. В.М. Домышевой и к.г.н. М.В. Сакирко; данные по составу и количественным характеристикам фитопланктона – сотрудниками Отдела ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН – д.б.н. Г.И. Поповской и к.б.н. М.В. Усольцевой.

В озере Байкал в период исследований температура поверхностных вод варьирует от 1,29 °С до 4 °С, кроме нескольких станций, расположенных в 3 км от восточного побережья средней и северной котловин в 2012 г. (до 5,42 °С) и в Чивыркуйском заливе (Чз) (до 8,3 °С). В озере на глубинах 0 м и 25 м рН воды изменяется в пределах 7,63–8,42, концентрации кислорода составляют 11,83–13,64 мг/л, кремния – 0,41–1,06 мг/л, фосфатов – 0,010–0,031 мг/л, нитратов – 0,18–0,45 мг/л. Концентрации биогенных элементов и кислорода подвержены межгодовым колебаниям, но имеют устойчивое пространственное распределение (Домышева и др., 2014). В 2012 г. общая биомасса фитопланктона в пелагиали озера (до 1 г/м³) ниже, чем в заливах (Чз, Бз) и проливе Малое Море (Мп) (2–5,6 г/м³). В южной котловине основной вклад в биомассу фитопланктона вносит вид диатомей *S. acus* subsp. *radians*; в средней – этот же вид и динофлагелляты *Gymnodinium baicalense* Antipova и *Peridinium baicalense* Kiselev et Cvetkov; в северной, Чз, Мп – диатомея *Aulacoseira baicalensis* (К. Meyer) Simonsen, в Бз – диатомея *Stephanodiscus meyeri* Genkal et Poroovskaya, *A. baicalensis*, *S. acus* subsp. *radians*. Общая численность бактерий (ОЧБ) в эпилимнионе озера варьирует от $0,2 \times 10^6$ кл./мл до $1,5 \times 10^6$ кл./мл, в Чз составляет $2,2 \times 10^6$ кл./мл (рис. 2).

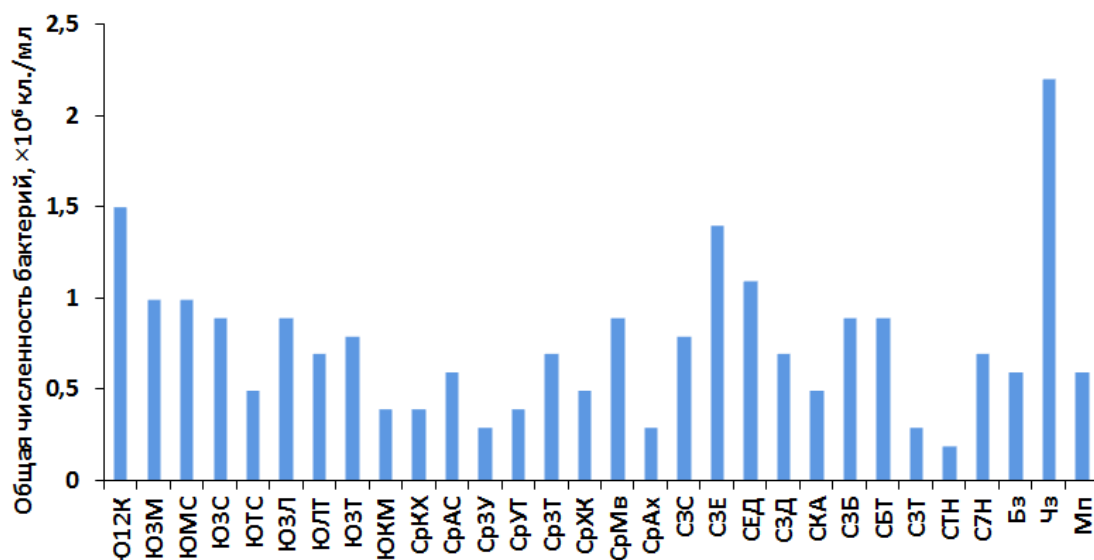


Рис. 2. ОЧБ в эпилимнионе озера Байкал в начале июня 2012 г.

Численность органотрофных бактерий, культивируемых на средах ДА и РПА/10, увеличивается от южной котловины к северной (рис. 3).

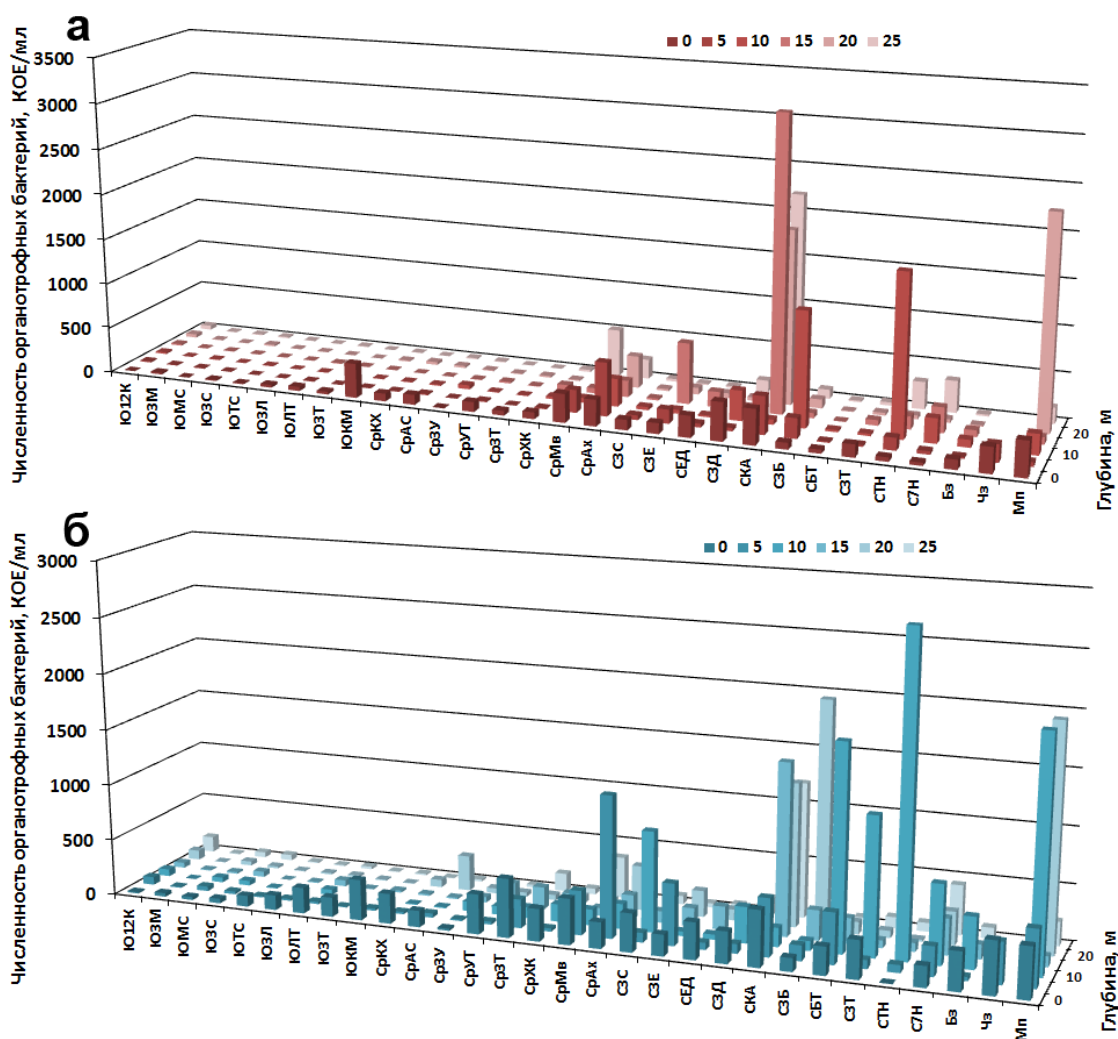


Рис. 3. Численность органотрофных бактерий, культивируемых на средах ДА (а) и РПА/10 (б), в эпилимнионе озера Байкал в начале июня 2012 г.

В южной котловине численность органотрофов достигает 378 КОЕ/мл, в средней котловине численность органотрофов до 1250 КОЕ/мл, в северной котловине – до 3200 КОЕ/мл, в Малом Море численность бактерий достигает 2350 КОЕ/мл (рис. 3).

ГЛАВА 4. Структура и разнообразие сообществ бактерий и одноклеточных эукариот эпилимниона озера Байкал по данным анализа фрагментов генов 16S рРНК и 18S рРНК

В результате пиросеквенирования ампликонов V3–V4 региона генов 16S рРНК для 30 образцов после выравнивания, прекластеризации, удаления химерных последовательностей получено 44942 последовательности средней длины 420 п. н., принадлежащих домену Bacteria. Для всех образцов выявлено 867 ОТЕ для генетической дистанции 0,03, из которых синглтонам (ОТЕ из

единичных последовательностей) принадлежит 399 ОТЕ. Богатство (количество ОТЕ) и разнообразие (индекс Шэннона) бактериальных сообществ выше в средней (90–439 и 3,02–4,00 соответственно) и северной (51–265 и 2,07–4,22) котловинах, чем в южной (70–137 и 3,15–3,90). Богатство и разнообразие выше в Чивыркуйском заливе (Чз) (173 и 3,81), по сравнению с Баргузинским заливом (Бз) (101 и 3,15) и проливом Малое Море (Мп) (85 и 3,44). В бактериальных сообществах эпилимниона Байкала выявлены представители филумов *Actinobacteria* (31,4 % последовательностей во всех образцах), *Bacteroidetes* (21 %), *Verrucomicrobia* (18,3 %), *Proteobacteria* (12,1 %), *Acidobacteria* (9,7 %), *Cyanobacteria* (3,1 %) (рис. 4). Филум *Proteobacteria* представлен классами *Alpha*- (4 %), *Beta*- (6,6 %), *Gamma*- (0,9 %), *Deltaproteobacteria* (0,1 %). Доминирующие филумы бактерий вносят основной вклад по количеству последовательностей и представлены во всех образцах в различных соотношениях (рис. 4). Минорные филумы *Planctomycetes*, *TM7*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes*, *Spirochaetes*, *BRC1*, *WS3*, *SR1*, *OD1*, *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *Chlamydiae* вносят небольшой вклад (1,8 %) в состав сообществ, но увеличивают их богатство и разнообразие. При сравнении бактериальных сообществ с помощью диаграмм Венна установлено, что количество общих ОТЕ в большинстве случаев выше, чем уникальных, и общим ОТЕ принадлежит наибольшее количество последовательностей (рис. 5). В сообществах из районов, отличающихся доминирующими видами фитопланктона, общим ОТЕ принадлежит больше последовательностей, чем уникальным ОТЕ (рис. 5), что свидетельствует о сходстве бактериальных сообществ, несмотря на различия в составе фитопланктона.

В результате пиросеквенирования ампликонов V3 регионов генов 18S рРНК и после выравнивания, прекластеризации, удаления химерных последовательностей для 30 образцов получено 260064 последовательностей одноклеточных эукариот средней длиной 180 п. н. Для всех образцов выявлено 2442 ОТЕ для генетической дистанции 0,03, из которых синглтонам принадлежит 1438 ОТЕ. Богатство и разнообразие выше в сообществах средней (178–406 и 2,94–3,60) и северной (49–427 и 2,49–3,84) котловин, чем в южной (102–315 и 2,16–3,37). В образце Мп меньше богатство (175) и больше разнообразие (3,39), по сравнению с Чз (371, 2,92) и Бз (312, 3,21).

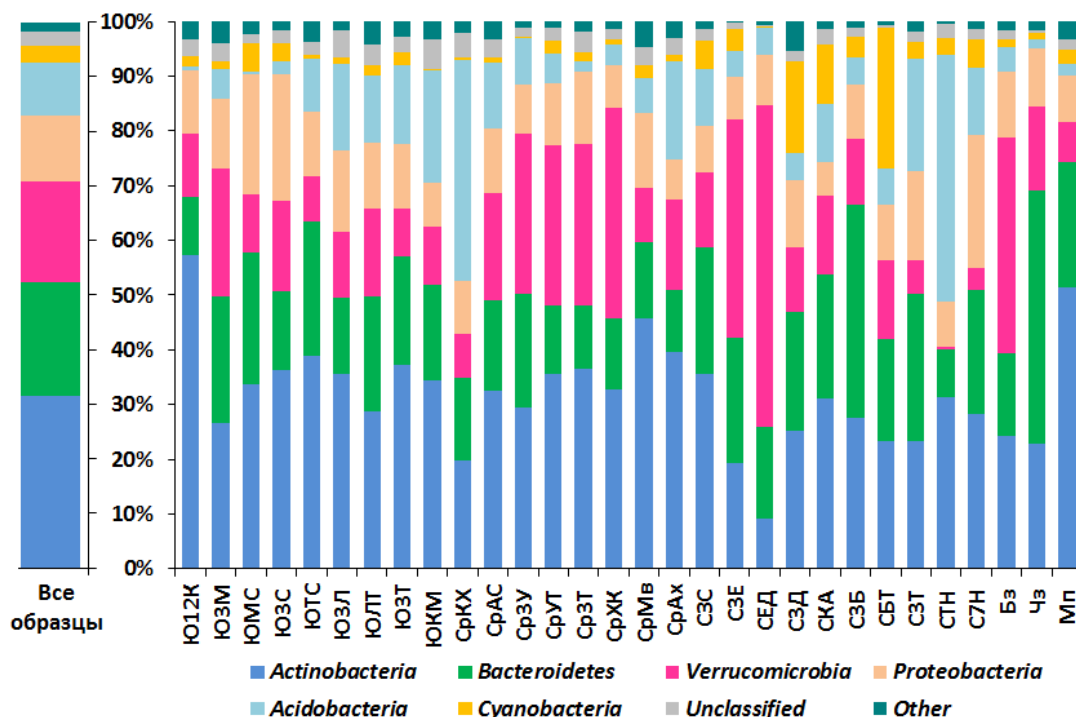


Рис. 4. Состав филумов домена Bacteria в эпилимнионе озера Байкал в начале июня 2012 г. по данным анализа последовательностей фрагментов генов 16S рРНК.

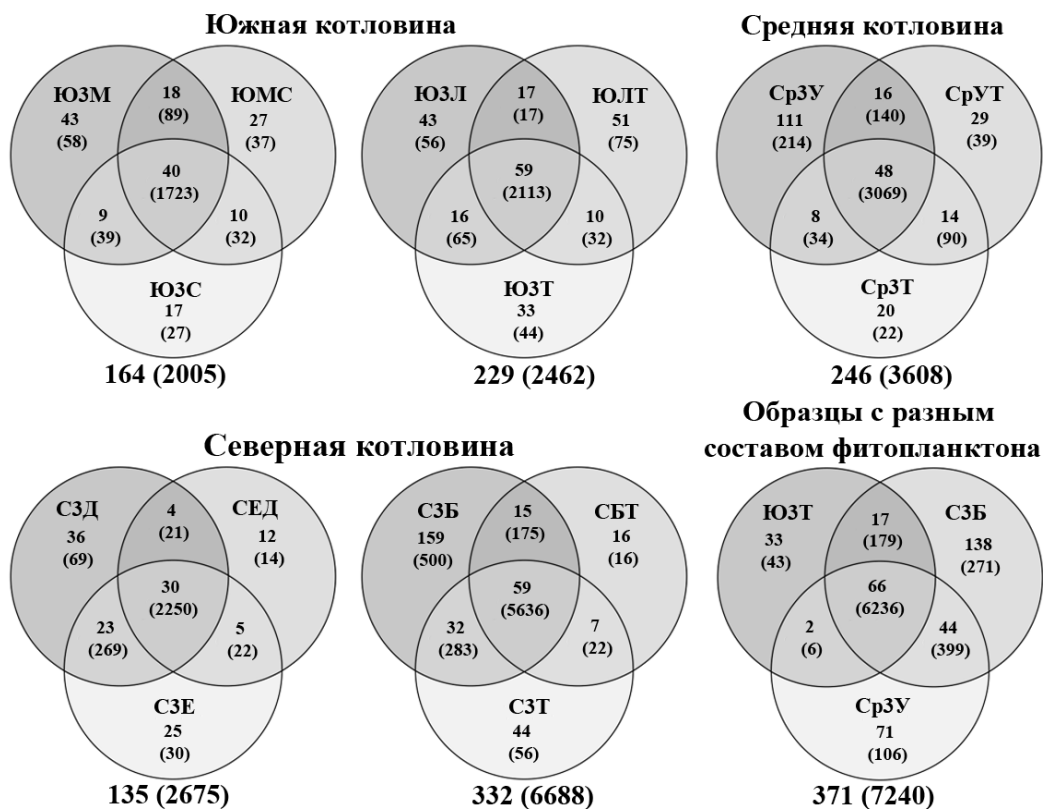


Рис. 5. Диаграммы Венна, построенные для ОТЕ 0,03 из бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал. Цифрами обозначено количество ОТЕ, цифрами в скобках – количество относящихся к ним последовательностей.

Во всех образцах последовательности фрагментов генов 18S рРНК принадлежат Eukaryota (79,1 %), неклассифицированным Eukaryota (15,9 %), таксонам с небольшим количеством последовательностей и синглетонам (5 %). В составе сообществ одноклеточных эукариот эпилимниона озера выявлены представители царств Chromista (61,7 % от общего количества последовательностей во всех образцах), Plantae (9,5 %), Fungi (7,3 %), Protozoa (0,6 %). Выявленные царства представлены типами Dinophyta (24,1 %); Ochrophyta (классы Chrysophyceae (9,9 %), Eustigmatophyceae (2,6 %), Dictyochophyceae (1,8 %), Synurophyceae (0,4 %)); Chlorophyta (9,2 %); Ciliophora (8,3 %); Cryptophyta (5,7 %); Haptophyta (4 %); Cercozoa (2,8 %); Bacillariophyta (1,3 %); Chytridiomycota (0,8 %); Katablepharidophyta (0,7 %); Choanozoa (0,6 %); Basidiomycota (0,6 %); Tracheophyta (0,3 %); Bigyra (0,1 %). Соотношение последовательностей таксонов домена Eukaryota в образцах варьирует (рис. 6).

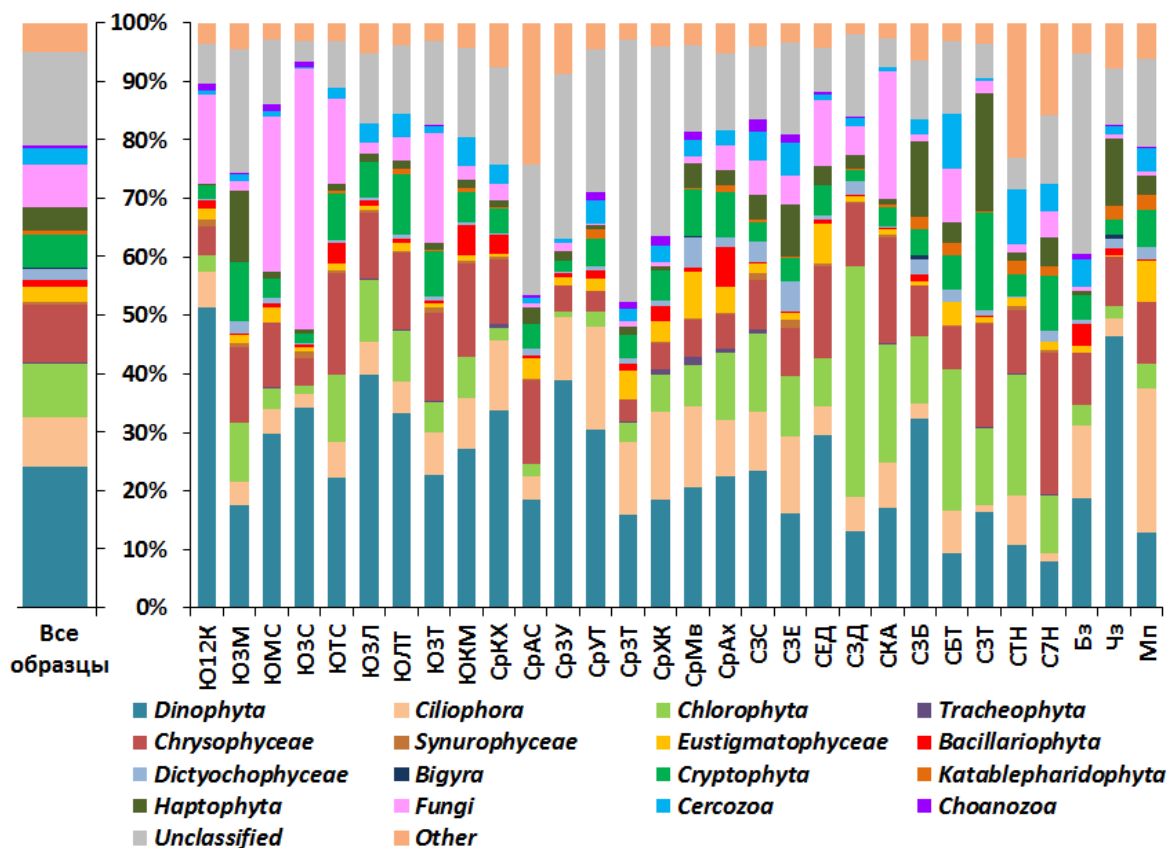


Рис. 6. Состав таксонов домена Eukaryota в эпилимнионе озера Байкал в июне 2012 г. по данным анализа последовательностей фрагментов генов 18S рРНК.

При сравнении бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал с помощью МГК с использованием индекса Брея-Кертиса показано, что

большинство сообществ группируются вместе и в некоторых случаях наибольшее сходство имеют сообщества из районов близко расположенных друг от друга (рис. 7), в то же время сообщества одноклеточных эукариот для тех же проб образуют несколько групп (рис. 8).

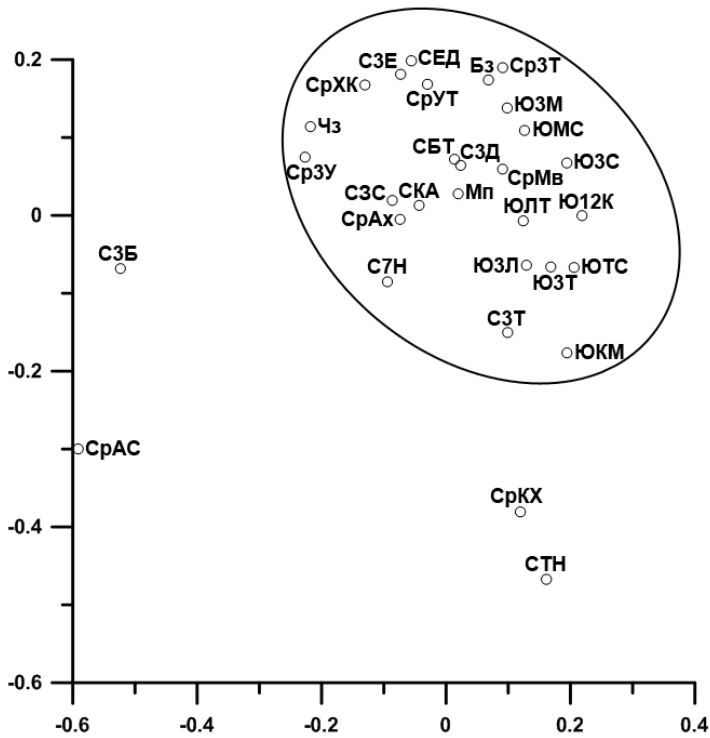


Рис. 7. Сравнение бактериальных сообществ эпилимниона озера Байкал в июне 2012 г. с помощью МГК на основании индекса сходства Брея-Кертиса.

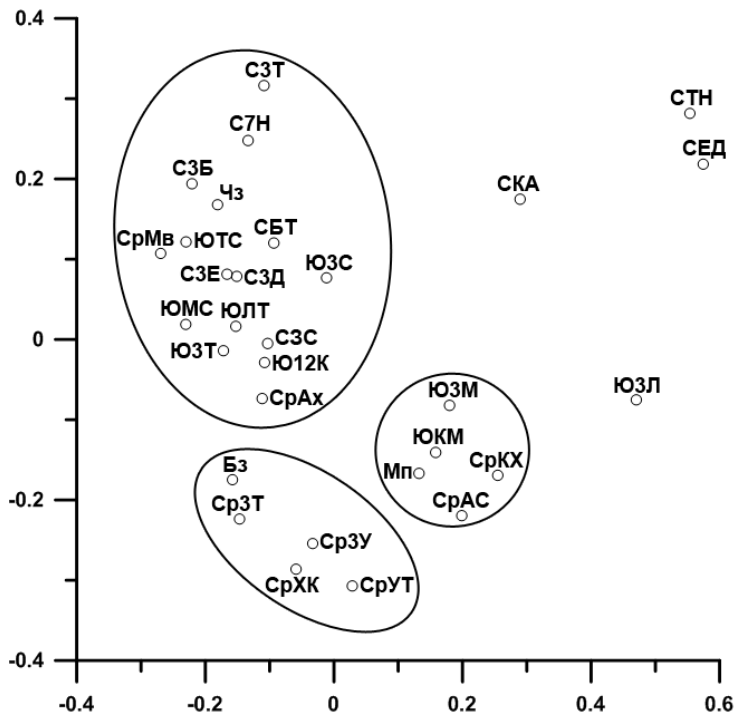


Рис. 8. Сравнение сообществ одноклеточных эукариот эпилимниона озера Байкал в июне 2012 г. с помощью МГК на основании индекса сходства Брея-Кертиса.

ГЛАВА 5. Численность и разнообразие бактерий, ассоциированных с микроводорослями из озера Байкал

В пробах эпилимниона озера Байкал выявлены альго-бактериальные ассоциации на основе диатомовых (*Synedra acus* subsp. *radians*, *Nitzschia graciliformis*, *Aulacoseira baicalensis*, *A. islandica*, *Stephanodiscus meyeri*, *Fragilaria crotonensis*, *Asterionella formosa*), зеленых (*Koliella longiseta*, *Monoraphidium arcuatum*, *M. griffiti*), хризофитовых (*Dinobryon cylindricum*) и криптофитовых водорослей (*Chryptomonas* sp.). Количество бактерий, ассоциированных с клетками различных микроводорослей, как правило, составляет $10^2 - 10^3$ кл./мл, что на четыре или три порядка ниже, чем общая численность бактерий (10^6 кл./мл) в этих пробах. При увеличении численности микроводорослей в основном увеличивается численность колонизирующих их бактерий. С помощью СЭМ показано, что бактерии в форме палочек, палочек со жгутиком, кокков, диплококков и нитевидных бактерий колонизируют клеточные стенки диатомей (рис. 9).

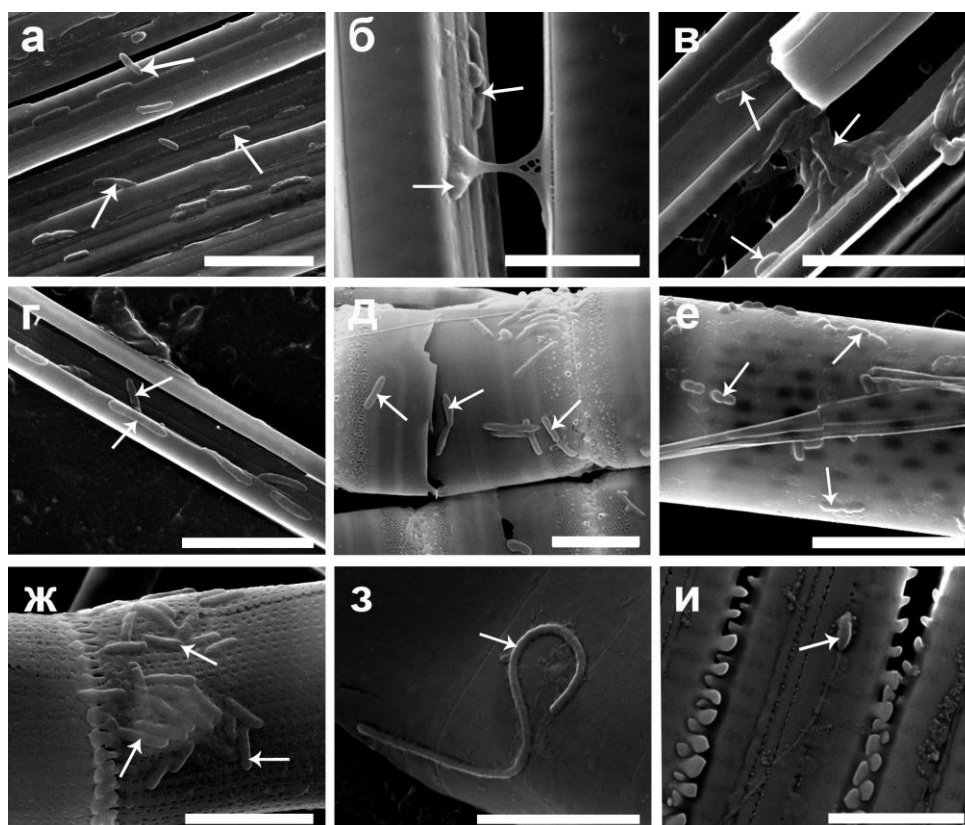


Рис. 9. Ассоциации диатомей и бактерий в пробах из эпилимниона озера Байкал. СЭМ: а, б, в, г – *S. acus* subsp. *radians*; д – *St. meyeri*; е, ж, з – *A. baicalensis*; и – *F. rotonensis*; стрелками указаны бактерии. Масштаб: а, в-д, ж, з – 5 мкм; б, и – 3 мкм; е – 10 мкм.

Из весеннего фитопланктона различных районов озера Байкал изолированы диатомовые водоросли, получены их лабораторные культуры. В результате филогенетического анализа определены филумы бактерий *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* из культур диатомей. В культуре *S. acus* subsp. *radians* на экспоненциальной фазе роста выявлены бактериальные последовательности, имеющие максимальное сходство с родом *Pseudomonas*; в культуре *Ast. formosa* – *Hydrogenophaga*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*; в культуре *F. crotonensis* – *Janthinobacterium*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*.

ГЛАВА 6. Получение аксеничной культуры диатомей

Synedra acus subsp. *radians* и ее миксотрофное культивирование

Для анализа взаимодействий бактерий и микроводорослей, проведения цитологических и полногеномных исследований необходимо получение аксеничных (безбактериальных) культур микроводорослей. Разработанный протокол получения аксеничной культуры включает ряд последовательных обработок культуры диатомей от ассоциированных с ними бактерий (рис. 10).

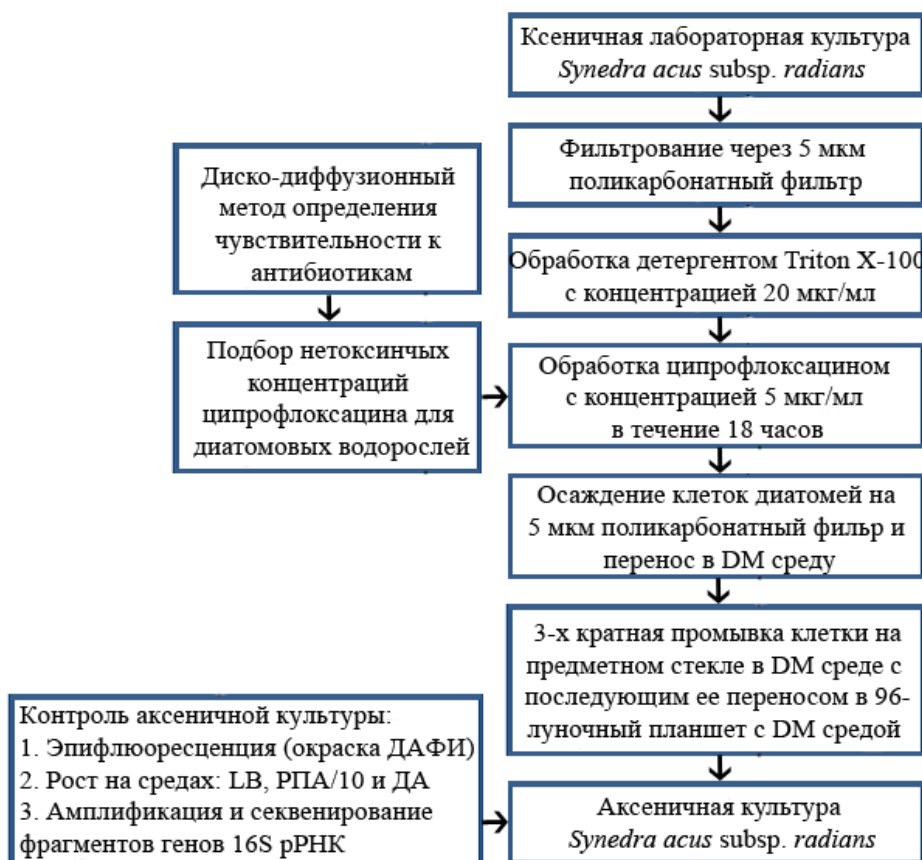


Рис. 10. Протокол получения аксеничной культуры планктонной диатомовой водоросли *S. acus* subsp. *radians* из озера Байкал.

Лабораторную культуру *S. acus* subsp. *radians* (рис. 11 а) осаждают на фильтр с диаметром пор 5 мкм (Millipore, США), в результате численность бактерий снижается с 10^6 до 10^3 кл./мл и удаляются бактерии, не прикрепленные к клеткам диатомей (рис. 11 б). При обработке культуры диатомей детергентом Triton X-100 в подобранной концентрации 20 мкг/мл, показавшей наилучший результат разделения клеток, разрушаются бактериальные агрегаты и удаляются бактерии с поверхности клеток диатомей (рис. 11 в). В результате обработки культуры диатомей ципрофлоксацином 5 мкг/мл в течение 18 ч, с последующей трехкратной промывкой клеток с помощью микропипетирования на предметном стекле в среде DM, изолирования единичных клеток диатомей и их дальнейшего культивирования в ячейках 96-луночных планшетов в среде DM, получена аксеничная культура *S. acus* subsp. *radians* (рис. 11 г). Проверка отсутствия бактерий проводится окрашиванием образцов ДАФИ, высевом на среды LB, РПА/10, ДА, амплификацией и секвенированием фрагментов генов 16S рРНК.

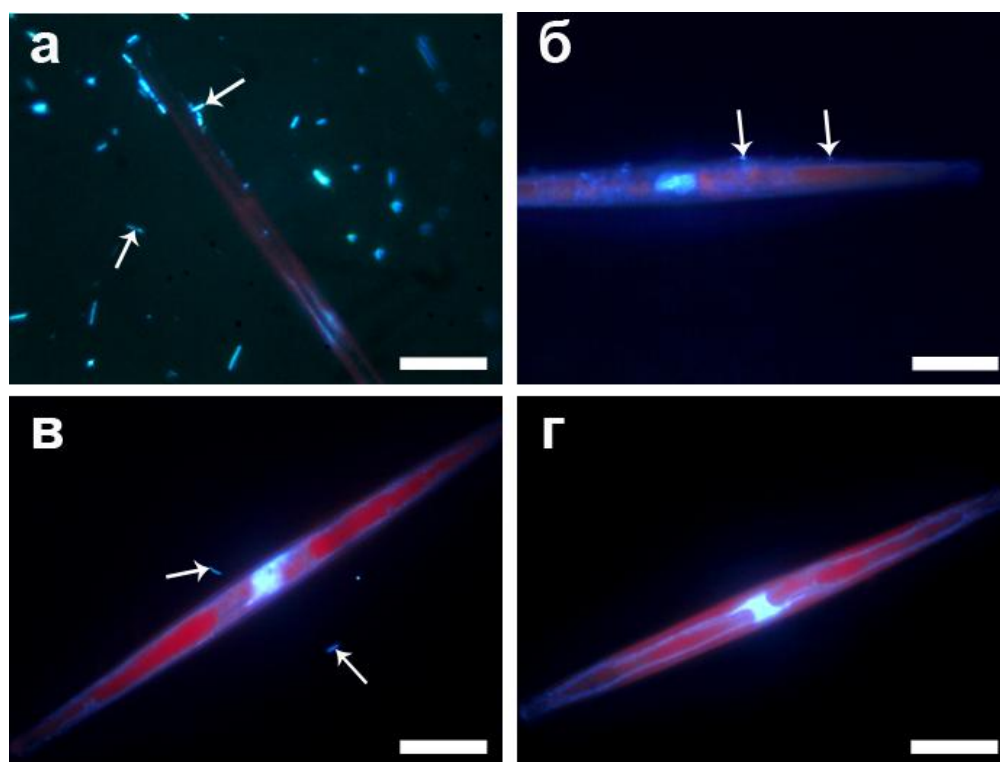


Рис. 11. Эпифлуоресцентная микроскопия диатомей *S. acus* subsp. *radians*, окрашенной ДАФИ: **а** – *S. acus* subsp. *radians*, ассоциированная с бактериями; **б** – *S. acus* subsp. *radians* после фильтрования; **в** – *S. acus* subsp. *radians* после обработки Triton X-100; **г** – аксеничная культура *S. acus* subsp. *radians*. Масштаб – 20 мкм.

Полученную аксеничную культуру *S. acus* subsp. *radians* использовали для исследования влияния миксотрофных условий роста на метаболизм и ультраструктуру клеток этой диатомеи. При культивировании аксеничной культуры *S. acus* subsp. *radians* с глицерином в концентрации 80 мМ на экспоненциальной фазе роста в клетках диатомеи увеличиваются в размерах липидные тела (до 2,5 мкм), повышается соотношение пальмитиновой и стеариновой кислот, что не наблюдается при культивировании диатомеи в автотрофных условиях и миксотрофных с глюкозой. При культивировании диатомеи с глюкозой в концентрации 40 мМ в клетках диатомеи выявлены вакуоли (0,5-0,7 мкм) с гетерогенным гранулярным и мелкозернистым содержимым (10-20 нм) (хризоломинарин), профиль жирных кислот не изменяется, в сравнении с автотрофными условиями и миксотрофными с глицерином (Shishlyannikov *et al.*, 2014). Таким образом, при миксотрофных условиях роста в клетках диатомеи *S. acus* subsp. *radians* происходят биохимические и ультраструктурные изменения.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено комплексное исследование альго-бактериальных сообществ в различных районах эпилимниона озера Байкал в весенне-летний период с помощью методов пиросеквенирования ампликонов фрагментов генов рРНК, эпифлуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии.

2. С помощью пиросеквенирования V3–V4 региона фрагментов генов 16S рРНК выявлено 20 филумов домена Bacteria. В общем количестве последовательностей во всех образцах 95,6 % составляют 6 филумов: *Actinobacteria* (31,4 %), *Bacteroidetes* (21 %), *Verrucomicrobia* (18,3 %), *Proteobacteria* (12,1 %), *Acidobacteria* (9,7 %), *Cyanobacteria* (3,1 %). Последовательности, принадлежащие филумам *Planctomycetes*, TM7, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Armatimonadetes*, *Spirochaetes*, BRC1, WS3, SR1, OD1, *Nitrospira*, *Deinococcus-Thermus*, *Chlamydiae* являются минорными.

2. С помощью пиросеквенирования V3 региона 18S рРНК выявлены представители царств Chromista (61,7 % от общего количества последовательностей во всех образцах), Plantae (9,5 %), Fungi (7,3 %), Protozoa (0,6 %), а также неклассифицированные Eukaryota (15,9 %). Определены типы Dinophyta (24,1 %); Ochrophyta (классы Chrysophyceae (9,9 %), Eustigmatophyceae (2,6 %), Dictyochophyceae (1,8 %), Synurophyceae (0,4 %));

Chlorophyta (9,2 %); Ciliophora (8,3 %); Cryptophyta (5,7 %); Haptophyta (4 %); Cercozoa (2,8 %); Bacillariophyta (1,3 %); Chytridiomycota (0,8 %); Katablepharidophyta (0,7 %); Choanozoa (0,6 %); Basidiomycota (0,6 %); Bigyra (0,1 %).

3. Анализ операционных таксономических единиц с помощью диаграмм Венна и метода главных компонент на основании индекса Брея-Кертиса показывает, что состав доминирующих таксонов бактерий сходен в различных районах эпилимниона озера Байкал со сходными физико-химическими условиями, но различающимися доминирующими видами фитопланктона.

4. С помощью микроскопии в пробах из эпилимниона озера Байкал выявлены альго-бактериальные ассоциации на основе диатомовых, зеленых, хризофитовых и криптофитовых водорослей. С помощью секвенирования и анализа фрагментов генов 16S рРНК определен таксономический состав бактерий в культурах планктонных диатомовых водорослей: *Synedra acus* subsp. *radians* – представители рода *Pseudomonas*; *Asterionella formosa* – *Hydrogenophaga*, *Methylophilus*, *Pseudomonas*, *Nocardioides*, *Flavobacterium*; *Fragilaria crotonensis* – *Janthinobacterium*, *Pedobacter*, *Flavobacterium*.

5. Разработана методика получения аксеничной культуры диатомовой водоросли *S. acus* subsp. *radians*, которая включает фильтрование культуры, обработку детергентом и антибиотиком, получение моноклональной культуры.

6. Установлено, что при культивировании аксеничной культуры *S. acus* subsp. *radians* в миксотрофных условиях с глюкозой или глицерином происходит изменение профиля жирных кислот и ультраструктуры клеток диатомеи.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Shishlyannikov S. M. A procedure for establishing an axenic culture of the diatom *Synedra acus* subsp. *radians* (Kütz.) Skabibitsch. from Lake Baikal / S. M. Shishlyannikov, Y. R. Zakharova, N. A. Volokitina, **I. S. Mikhailov**, D. P. Petrova, Y. V. Likhoshway // Limnology and Oceanography: Methods. – 2011. – 9. – P. 478–484.

2. Shishlyannikov S. M. Effect of mixotrophic growth on the ultrastructure and fatty acid composition of the diatom *Synedra acus* from Lake Baikal / S. M. Shishlyannikov, I. V. Klimenkov, Y. D. Bedoshvili, **I. S. Mikhailov**, A. G. Gorshkov // Journal of Biological Research-Thessaloniki. – 2014. – 21:15. – P. 1–8.

3. **Михайлов И. С.** Об однородности таксономического состава бактериальных сообществ фотического слоя трех котловин озера Байкал, различающихся по составу и обилию весеннего фитопланктона / **И. С. Михайлов**, Ю. Р. Захарова, Ю. П. Галачьянц, М. В. Усольцева, Д. П. Петрова,

М. В. Сакирко, Е. В. Лихошвай, М. А. Грачев // ДАН. – 2015. – Т. 465, № 5. – С. 1–7.

Материалы конференций:

4. Шишлянников С. М. Протокол получения аксеничной культуры диатомовой водоросли *Synedra acus* subsp. *radians* из озера Байкал / С. М. Шишлянников, Ю. Р. Захарова, Н. А. Волокитина, **И. С. Михайлов**, Д. П. Петрова, Е. В. Лихошвай, М. А. Грачев // Пятая Верещагинская Байкальская конференция. Иркутск, 2010. – С. 114–115.

5. **Михайлов И. С.** Влияние глюкозы, глицерина и гидролизата казеина на рост *Synedra acus* из озера Байкал при миксотрофных условиях культивирования / **И. С. Михайлов**, С. М. Шишлянников // Пятая Верещагинская Байкальская конференция. Иркутск, 2010. – С. 106–107.

6. Захарова Ю. Р. Распределение микроорганизмов, ассоциированных с диатомовыми водорослями, в глубоководных районах озера Байкал / Ю. Р. Захарова, М. В. Усольцева, **И. С. Михайлов** // Материалы 3-го Байкальского Микробиологического симпозиума с международным участием. Иркутск, 2011. – С. 153–154.

7. **Михайлов И. С.** Микроорганизмы, ассоциированные с диатомовыми водорослями озера Байкал / **И. С. Михайлов** // Материалы XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2013» секция «Биология». Москва, 2013. – С. 107–108.

8. **Михайлов И. С.** Структура альго-бактериальных сообществ пелагиали озера Байкал / **И. С. Михайлов**, Ю. Р. Захарова, М. В. Усольцева, Д. П. Петрова, Ю. П. Галачянц // Материалы VI Всероссийского с международным участием конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013». Иркутск, 2013. – С. 215–216.

9. **Михайлов И. С.** Анализ сообществ одноклеточных эукариот эпителии озера Байкал методом пиросеквенирования фрагментов гена 18S рРНК / **И. С. Михайлов**, Ю. Р. Захарова, Ю. П. Галачянц, Д. П. Петрова, Е. В. Лихошвай // Тезисы докладов и стендовых сообщений Шестой международной Верещагинской Байкальской конференции. Иркутск, 2015. – С. 138–140.

10. Волокитина Н. А. Культивирование диатомовых водорослей из озера Байкал / Н. А. Волокитина, **И. С. Михайлов**, Ю. Р. Захарова // Тезисы докладов и стендовых сообщений Шестой международной Верещагинской Байкальской конференции. Иркутск, 2015. – С. 221–222.

11. **Михайлов И. С.** Таксономический состав бактерий в культурах диатомовых водорослей, изолированных из озера Байкал / **И. С. Михайлов**, Ю. Р. Захарова, Н. А. Волокитина, Е. В. Лихошвай // Тезисы докладов и стендовых сообщений 4-го Байкальского Микробиологического симпозиума с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах». Иркутск, 2015. – С. 289–290.