

*На правах рукописи*

*А.Глад*

**ГЛАДКИХ Анна Сергеевна**

**СООБЩЕСТВА ЦИАНОБАКТЕРИЙ В БИОПЛЕНКАХ И  
ПЛАНКТОНЕ ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

03.02.08 – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск – 2012

Работа выполнена в отделе микробиологии ЛИН СО РАН, г. Иркутск

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент

**Белых Ольга Ивановна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор

**Чхенкели Вера Александровна**

доктор биологических наук, профессор

**Бузолева Любовь Степановна**

Ведущая организация: Сибирский федеральный университет

Защита диссертации состоится 25 мая 2012 г. в 11:00 часов 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.

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 24 апреля 2012 года.

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



А.А. Приставка

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Цианобактерии – фотоавтотрофные прокариоты, населяющие различные экологические ниши: от арктических озер до термальных источников. В водных экосистемах они создают первичную продукцию и являются существенным ресурсом в пищевых цепях, входя в состав как планктонных, так и бентосных сообществ. Важная экологическая роль цианобактерий обуславливается их уникальной способностью к фиксации молекулярного азота атмосферы. В результате биологической азотфиксации до 60% атмосферного азота может связываться и выделяться в воду в виде аммонийных солей (Howarth *et al.*, 1988; Костяев, 2001).

Озеро Байкал – древнейшее и самое глубокое пресноводное озеро в мире. Цианобактерии в Байкале играют значительную роль, их вклад в первичную продукцию в летний период достигает 60-90% (Вотинцев и др., 1972; Бондаренко, Гусельникова, 1989). Изучение видового состава и динамики нанопланктонных цианобактерий с помощью световой микроскопии имеет многолетнюю историю (Поповская, 1991; Бондаренко, 1995). Недавно комплексом методов проведено исследование пикопланктонных цианобактерий (Belykh, Sorokovikova, 2003; Тихонова, 2006; Белых и др., 2011). Зона литорали занимает около 14% от общей площади Байкала, однако процессы, протекающие в прибрежье, играют важную роль и оказывают влияние на биоту всего озера (Колокольцева, 1968; Фиалков, 1983). Цианобактерии оз. Байкал, входящие в состав мейо- и макрофитобентоса (колонии размером 0,5 мм и более), изучены в работах Л. Ижболдиной (Ижболдина, 1990, 2007). Однако цианобактерии, формирующие микроскопические колонии, не были охвачены данными исследованиями.

В последнее десятилетие такое экологическое явление как «цветение» водоемов, обусловленное массовым развитием цианобактерий, стало объектом пристального изучения. Во время «цветения» не только снижается качество воды, но и нередко синтезируются цианотоксины, которые представляют угрозу для жизни и здоровья человека и животных (Chorus, Bartram, 1999). В связи с усиливающейся антропогенной нагрузкой в туристско-рекреационных зонах оз. Байкал возникла необходимость оценить потенциальную опасность развития токсичных «цветений» в регионе.

В настоящее время для изучения биоразнообразия и особенностей функционирования сообществ выработан новый перспективный подход – метагеномный анализ на основании данных пиросеквенирования. Во многих странах мира активно проводятся широкомасштабные метагеномные исследования микроорганизмов различных биотопов (Breitbart *et al.*, 2004; Venter *et al.*, 2004; DeLong *et al.*, 2006; Sogin *et al.*, 2006; Rusch *et al.*, 2007; и др.), в России это направление только начинает развиваться.

**Цель и задачи.** Целью работы было изучить состав, генетическое разнообразие и структуру сообществ цианобактерий в планктоне и

био пленках, формирующихся на различных субстратах в литоральной зоне оз. Байкал, а также определить их способность к азотфиксации и токсичность.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Определить таксономический состав и роль цианобактерий в сообществах биопленок, формирующихся на разных субстратах в литоральной зоне оз. Байкал, используя методы световой и электронной микроскопии.
2. Изучить генетическое разнообразие и провести сравнительный анализ сообществ цианобактерий из биопленок и планктона на основе последовательностей гена 16S рРНК, полученных различными методами: пиросеквенированием и секвенированием по Сэнгеру.
3. Выявить азотфиксирующие виды цианобактерий в сообществах биопленок и планктона на основе последовательностей гена нитрогеназы *nifH*.
4. Выявить токсигенные виды цианобактерий в био пленках и планктоне с помощью набора праймеров к домену аминотрансферазы (АМТ) *msuE*-гена и определить методом иммуноферментного анализа (ИФА) содержание в воде микроцистинов – основных токсинов цианобактерий.

**Научная новизна работы.** Впервые дана комплексная характеристика сообществ цианобактерий из биопленок литоральной зоны оз. Байкал методами микроскопии, метагеномного анализа, клонирования и секвенирования. Показана структурообразующая роль цианобактерий в составе биопленок. Обнаружено, что видовой состав сообществ цианобактерий в био пленках зависит от типа субстрата. Дана оценка генетического разнообразия цианобактерий на основании анализа последовательностей гена 16S рРНК как в био пленках, так и в планктоне. Впервые определены генотипы азотфиксирующих цианобактерий. Описано 12 новых для Байкала видов цианобактерий, проведена ревизия таксономического состава планктонных и бентосных цианобактерий оз. Байкал на основании современного подхода в систематике и последовательностей гена 16S рРНК. Выявлены потенциально токсичные цианобактерии в оз. Байкал и водохранилищах Иркутской области с использованием генетических маркеров. Впервые методом ИФА установлено наличие микроцистинов в Усть-Илимском водохранилище.

**Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.** Результаты диссертационной работы расширяют представления о составе сообществ цианобактерий оз. Байкал. Методом пиросеквенирования получено более 30 тыс. нуклеотидных последовательностей. Созданная база данных имеет практическое значение для обнаружения и выделения организмов, обладающих потенциально новыми свойствами для использования в биотехнологии. Полученные и внесенные в мировую базу данных GenBank последовательности генов цианобактерий могут быть использованы при разработке групп- и видоспецифичных зондов для гибридизации. Разработан и апробирован

метод детекции генов синтеза микроцистинов. С помощью выбранного генетического маркера можно определять потенциальную токсичность у широкого ряда цианобактерий. Апробирован метод выявления и определения концентрации микроцистинов в воде с помощью ИФА. Используемый комплекс методов может быть рекомендован для проведения мониторинга водоемов, водоохранных мероприятий и оценки качества питьевой воды.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Сообщества цианобактерий в биопленках и планктоне оз. Байкал характеризуются высоким таксономическим и генетическим разнообразием. В составе биопленок цианобактерии отвечают за формирование их структуры.
2. В составе как бентосных, так и планктонных сообществ оз. Байкал развиваются цианобактерии, способные к азотфиксации.
3. Генетическая идентификация потенциально токсичных видов на основе анализа последовательностей маркерных генов синтеза микроцистинов оптимальна для экспресс-мониторинга олиготрофных водоемов. При наличии токсиногенных цианобактерий целесообразно использование иммуноферментного анализа для определения концентрации микроцистинов в пробах воды.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на всероссийской научной конференции «Биоразнообразие экосистем внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006), международном научном семинаре «Новые технологии в интегративной биологии и медицине» (Таиланд, 2006), молодежной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск, 2007), международной молодежной конференции «Экология 2007» (Архангельск, 2007), международной научно-практической конференции «Современные проблемы водохранилищ и их водосборов» (Пермь, 2007), «Ежегодных научно-теоретических конференциях аспирантов и студентов» (Иркутск, 2006, 2007), международном симпозиуме «Экология» (Болгария, 2007), V конференции молодых ученых СО РАН (Новосибирск, 2007), II и III байкальских микробиологических симпозиумах (Иркутск, 2007, 2011), III и IV международных научных конференциях «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды» (Белоруссия, 2007, 2011), III и IV международных конференциях молодых ученых (Украина, 2007, 2011), съезде микробиологического общества Великобритании (Великобритания, 2008), X съезде гидробиологического общества РАН (Владивосток, 2009), V международном симпозиуме по древним озерам (Македония, 2009), международной конференции «Проблемы экологии» (Иркутск, 2010), международной конференции «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний» (Улан-Удэ – Улан-Батор, 2011), европейском конгрессе микробиологов «FEMS, 2011» (Швейцария, 2011).

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненных согласно плану НИР в отделе микробиологии ЛИН СО РАН в рамках базовых проектов. Фактические данные получены автором при его непосредственном участии в экспедиционных и лабораторных работах, включая анализ и обобщение полученных результатов. Работа по определению содержания микроцистинов выполнена на базе Сахалинского НИИ рыбного хозяйства и океанографии (г. Южно-Сахалинск).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 155 страницах, содержит 11 таблиц и 28 рисунков. Список литературы включает 278 источников, из которых 50 на русском языке и 228 на иностранных языках.

**Благодарности.** Выражаю искреннюю признательность научному руководителю к.б.н. Ольге Ивановне Белых. Благодарю к.б.н. Е.Г. Сороковикову, к.б.н. И.В. Тихонову, д.б.н. Т.И. Земскую, к.б.н. Т.В. Бутину, д.б.н. О.А. Тимошкина, к.г.-м.н. А.Н. Сутурина, Т.А. Могильникову, С.А. Потапова за ценные советы, рекомендации и помощь при написании диссертации. Выражаю благодарность сотрудникам отдела микробиологии и отдельно зав. отделом к.б.н. В.В. Парфеновой за помощь в организации работы, предоставление реактивов и консультации, а также сотрудникам приборных центров «Электронная микроскопия», «Секвенирование» и водолазной группе лаборатории ихтиологии.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы дана общая характеристика цианобактерий, рассмотрены современные подходы к их систематике. Приведены литературные данные по видовому составу, численности и распределению нанопланктонных цианобактерий в оз. Байкал. Дана общая характеристика микробных биопленок. Проведен анализ молекулярных методов, применяемых для изучения сообществ цианобактерий. Рассмотрены история и методы изучения процессов азотфиксации в водоемах. Отдельный раздел посвящен токсичности цианобактерий и механизму синтеза микроцистинов.

### Глава 2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись сообщества нанопланктонных цианобактерий, развивающиеся в прибрежных биотопах оз. Байкал, а также сообщества цианобактерий в составе биопленок, формирующихся на горных породах, наиболее распространенных в береговой зоне озера.

Планктонные пробы отбирали в 2005-2010 гг. с помощью системы батометров SBE-32 (Carousel Water Sampler, Sea Bird Electronics Inc., США), сетями Апштейна и Джели по всей акватории оз. Байкал, а также в

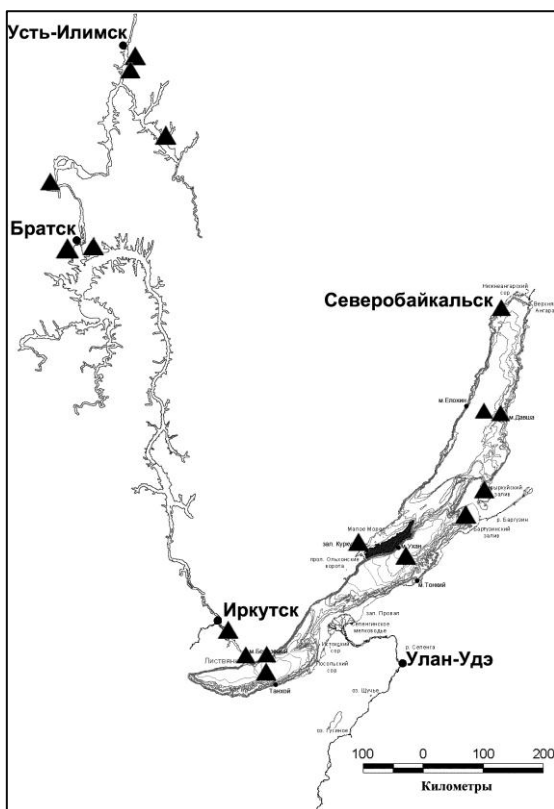


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб: ● – города, ▲ – станции отбора проб.

глутаральдегидом и дегидратировали в спиртах восходящей концентрации. После сушки в критической точке (Balzers CPD 030 Critical Point Dryer, Bal-Tec AG, Лихтенштейн) образцы помещали на столики, напыляли золотом в установке Balzers SCD 004 и исследовали в микроскопе Quanta 200 (FEI Co., США).

ДНК из образцов выделяли реагентами «ДНК-сорб» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). ПЦР проводили на приборе «Бис» (Россия), используя пары праймеров, комплементарные участкам генов 16S рРНК, *nifH* и АМТ домена *msuE*-гена. Трансформацию и клонирование осуществляли по стандартным методикам (Sambrook *et al.*, 1989). Определение нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов проводили на секвенаторе Beckman CEQ 8800 (Beckman Coulter Inc., США). При помощи пакета программ MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) полученные последовательности выравнивали, производили расчет генетических дистанций и филогенетические реконструкции на основе последовательностей гена 16S рРНК и АМТ домена гена *msuE*. Филогенетическую реконструкцию на основе нуклеотидных последовательностей гена *nifH* проводили байесовским методом с помощью программы MrBayes 3.1.2 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). Пиросеквенирование фрагментов гена 16S рРНК произведено компанией ChunLab Inc. (Респ. Корея, г. Сеул) на приборе 454 Genome Sequencer FLX Titanium (Roche, Швейцария). Метагеномный анализ, расчет коэффициентов

водохранилищах р. Ангара (рис. 1). Биопленки снимали с поверхностей пластин из мрамора, гранита, амфиболита и нержавеющей стали в апреле 2011 г. Пластины были помещены на дно озера на глубину 7 м в районе м. Березовый (Южный Байкал) в 2005 г. (Тимошкин и др., 2009). В качестве контроля использовали залегающие рядом с пластинами необработанные камни (плагииграниты). Всего в ходе исследования было отобрано и обработано 178 проб. Микроскопическое наблюдение проводили с помощью светового микроскопа Axio Imager (Zeiss, Германия). Таксономическое положение цианобактерий идентифицировали по определителям (Komárek, Anagnostidis, 1999, 2005; Komárek, Hauer, 2011). Для оценки степени видового сходства использовали коэффициент Серенсена. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) пробы фиксировали

видового разнообразия ACE и Chao1 проводили с помощью пакетов программ Mothur 1.23.1 (Schloss *et al.*, 2009) и Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu>). Нуклеотидные последовательности (157 штук) депонированы в GenBank под номерами EU031808, JF739283–88, JF781282–98, JN887825–77, JQ068804–06, JQ685757–81, JQ700509–59. Последовательности, полученные методом пиросеквенирования (более 30 тыс.), помещены в базу данных ChunLab Inc. Концентрацию микроцистинов определяли методом ИФА с помощью набора «Microcystins ADDA-ELISA» (Abraxis BioScience Inc., США). Статистическая обработка данных произведена с использованием программ RIDA SOFT Win («Стайлаб», Россия) и Microsoft Excel 2010 для Windows (Корп. Microsoft, США).

### **Глава 3. Видовой состав и роль цианобактерий в биопленках различных субстратов озера Байкал**

Видовой состав цианобактерий-обрастателей пяти различных субстратов включал 16 видов, принадлежащих порядкам Chroococcales, Oscillatoriales и Nostocales. Десять из них ранее не приводились в списках бентосных и планктонных цианобактерий оз. Байкал. Большинство отмеченных видов – представители бентоса, главным образом, эпилиты и эпифиты.

Сообщества цианобактерий активно развивались на мраморе, биопленки других субстратов отличались меньшим обилием цианобактерий. В обрастаниях каменистых субстратов можно выделить два доминирующих комплекса видов: «ривуляриевый», образованный *Rivularia rufescens* с видами-спутниками, поселяющимися в ее колониях – *Leptolyngbya rivulariarum* и *Schizothrix rivulariarum*, и «толипотриксиковый», состоящий из *Tolypothrix limbata* и вида-эпифита на его нитях – *Leibleinia epiphytica* (рис. 2а-в). «Ривуляриевый» комплекс развивался на мраморе, граните, амфиболите и контрольном субстрате (плаггиограните), «толипотриксиковый» – на мраморе и контрольном субстрате.

Видовой состав цианобактерий-эпилитов на экспериментальных пластинах, экспонированных при одинаковых гидрофизических и гидрохимических условиях (глубина, температура, pH, освещенность, концентрация биогенных элементов в воде), был обусловлен свойствами субстратов, на которых развивались биопленки. Ранее было показано, что геологический тип пород (петрографический состав, физические свойства) может оказывать влияние на биоразнообразие и продукционные характеристики зоо- и микробиобентоса (Timoshkin *et al.*, 2003). Предпочтение цианобактериями мрамора другим породам может быть связано с высоким содержанием кальция в его составе. Активно развивающийся на мраморе «ривуляриевый» комплекс представлен кальцефильными видами. Также большое значение для гидробионтов имеют физические свойства субстрата. В ряду горных пород мрамор-гранит-амфиболит, расположенных по убыванию видового разнообразия цианобактерий, наибольшей пористостью отличается мрамор, наименьшей –



амфиболит, что подтверждает значимость данного фактора для цианобактерий-эпилитов. Наличие пор и микротрещин облегчает бактериальную адсорбцию и способствует заселению субстрата микроорганизмами (Парфенова и др., 2008; Timoshkin *et al.*, 2003).

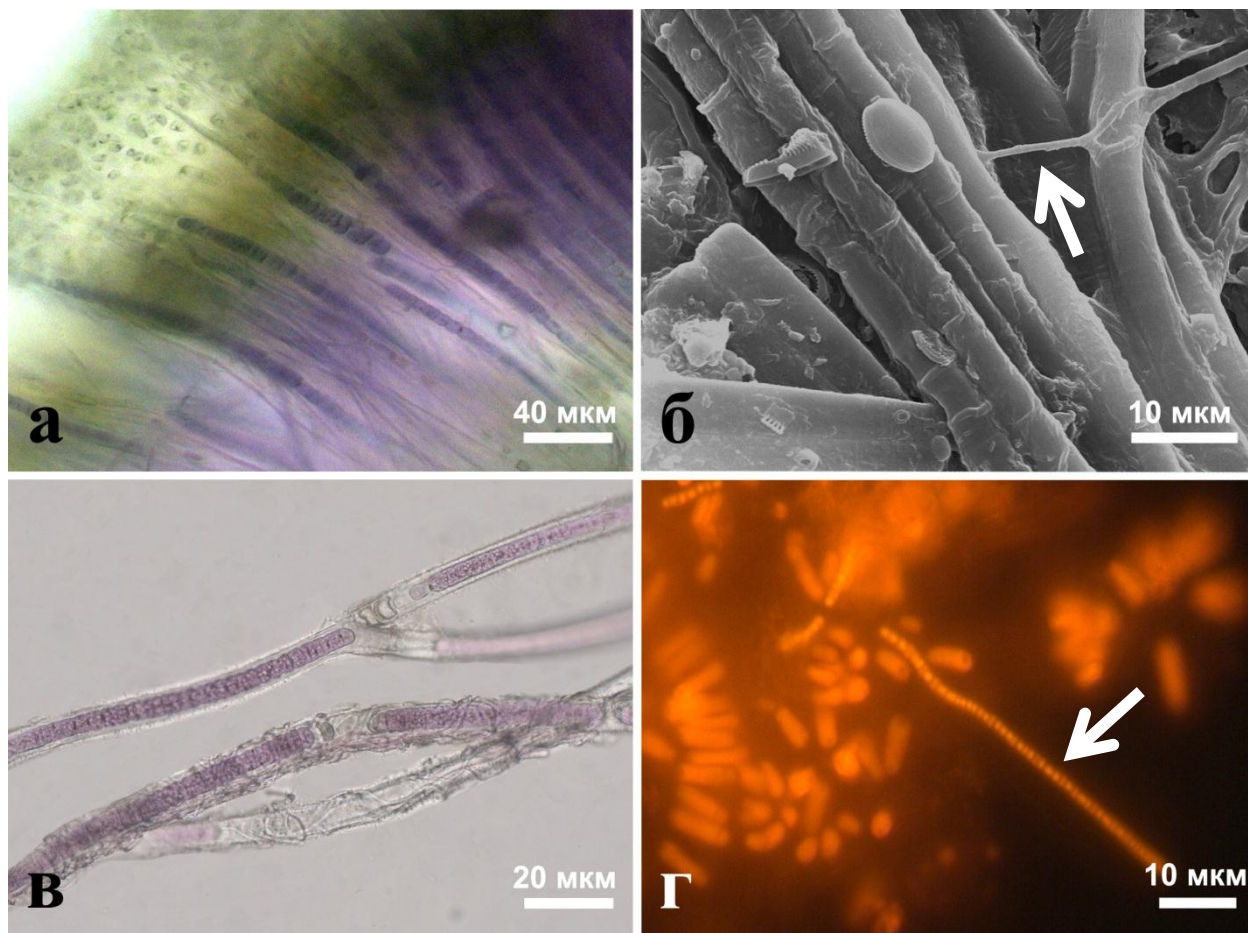


Рис. 2. Доминирующие виды цианобактерий в составе обрастаний: а – колония *R. rufescens*, б – *R. rufescens*, *S. rivulariarum* (стрелка), в – *T. limbata*, г – *C. fuscus*, *H. pusilla* (стрелка). А, в – световая микроскопия; б – СЭМ; г – флуоресцентная микроскопия.

В обрастаниях стальных пластин развивался комплекс видов с доминированием *Chamaesiphon fuscus* и *Heteroleibleinia pusilla* (рис. 2г), нехарактерный для каменистых субстратов. Цианобактерии-обрастатели нержавеющей стали отличались малыми размерами клеток и наличием слизистых чехлов и псевдовлагалищ. Данные морфологические особенности позволили им прикрепиться к гладкому, химически инертному субстрату и колонизировать его, получая биогенные элементы только из окружающей водной среды, без дополнительного их притока из субстрата.

На основании данных световой и электронной микроскопии показано, что цианобактерии составляли основную массу обрастаний естественных и искусственного субстратов. Так, на каменистых субстратах колонии *R. rufescens* располагались плотными подушками из слипшихся тяжей,

формируя, таким образом, трехмерный каркас биопленки (рис. 3). Более мелкие по размеру гетеротрофные бактерии и диатомовые водоросли локализовались между трихомами цианобактерий или на поверхности их колоний. На стальных пластинах архитектуру биопленок определяли коккоидные цианобактерии рода *Chamaesiphon* и нитчатая *N. pusilla*. Вырабатываемый цианобактериями полисахаридный матрикс и их трихомы составляли основу биопленок, выполняя структурообразующую, адгезивную и защитную функции.

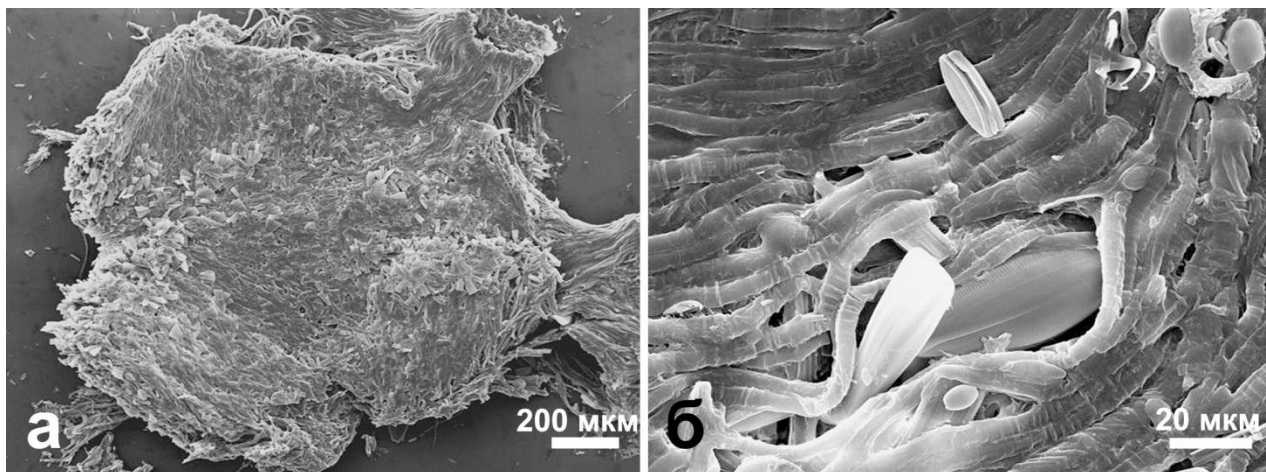


Рис. 3. Структура биопленки мрамора: а – общий вид обрастания, б – трихомы *R. rufescens* с погруженными в их матрикс диатомовыми водорослями и гетеротрофными бактериями. СЭМ.

#### Глава 4. Генетическое разнообразие цианобактерий в биопленках и планктоне литоральной зоны озера Байкал

В составе сообществ биопленок в различных соотношениях доминировали три бактериальные филы: Cyanobacteria, Proteobacteria и Bacteroidetes. Фила Cyanobacteria являлась самой многочисленной на мраморе и стальной пластине; на граните, амфиболите и контрольном субстрате – третья по численности (рис. 4).

Цианобактерии в обрастаниях каменистых субстратов были в основном представлены видами порядков Nostocales и Oscillatoriales. На мраморе доля Nostocales составляла 80,8%, Oscillatoriales – 18,0%, на граните – 51,1% и 43,4%, на амфиболите – 37,4% и 54,9%, на контрольном субстрате – 32,6% и 66,4%, соответственно. На стальной пластине преобладали представители порядка Chroococcales (54,1%), несколько меньше было Oscillatoriales (42,7%) и минимальное количество – Nostocales (3,1%).

По количеству выявленных фило типов и расчетным значениям видового богатства наиболее разнообразным было цианобактериальное сообщество на мраморе (35 фило типов) (табл. 1). Сообщества гранита и амфиболита были менее богаты (21 и 28 фило типов, соответственно). Минимальное видовое разнообразие выявлено на контрольном субстрате (20 фило типов). Цианобактериальное сообщество стальной пластины, как и сообщество мрамора, отличалось значительным видовым разнообразием:

выявлено 30 филогенов, при этом коэффициенты видового богатства были высокими.

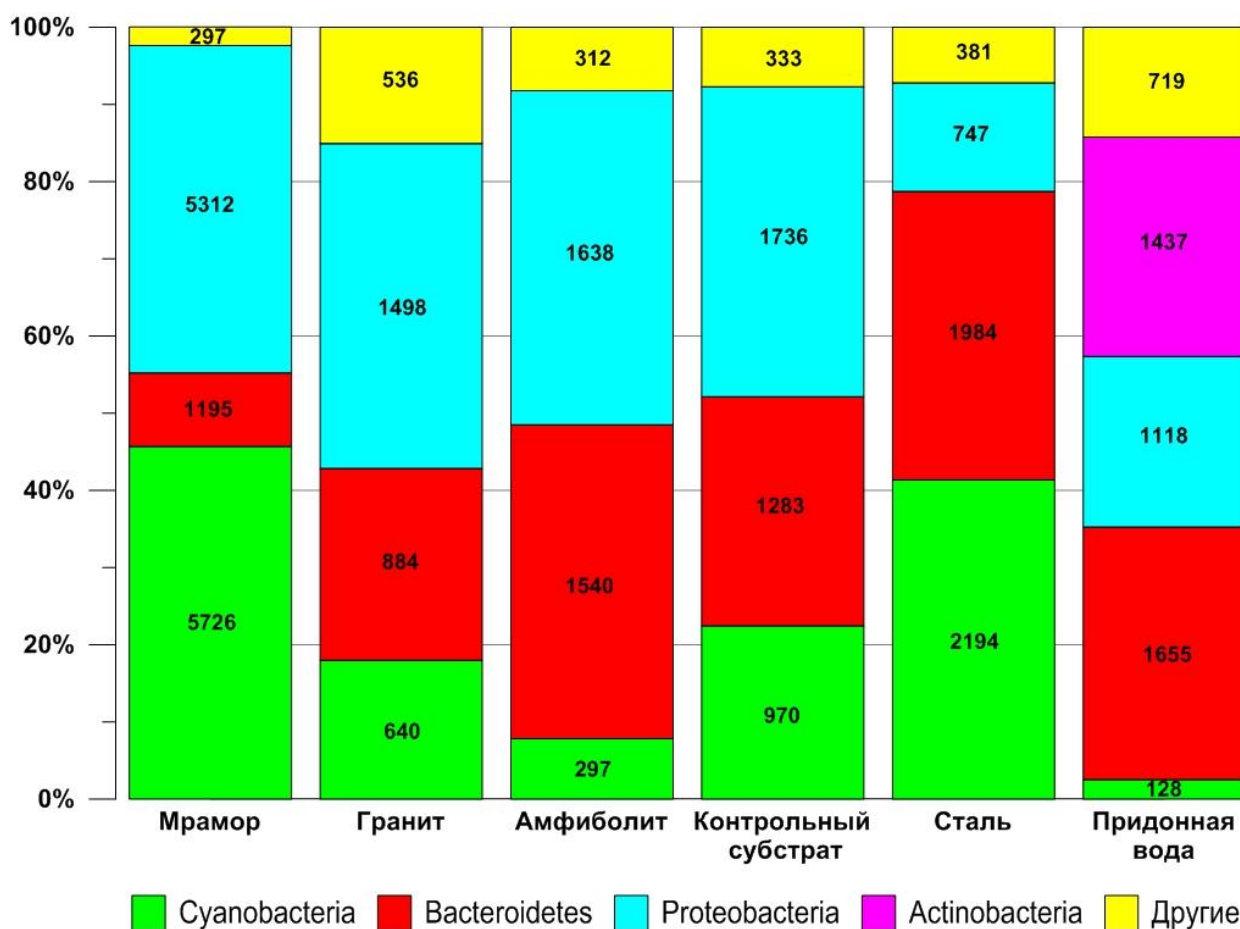


Рис. 4. Метагеномный анализ сообществ биопленок и придонной воды из литоральной зоны оз. Байкал на основании последовательностей фрагмента гена 16S рРНК.

Таким образом, учитывая данные микроскопии и метагеномного анализа, в условиях литорали оз. Байкал мрамор является наиболее благоприятным естественным субстратом для развития цианобактерий. Минимальное количество филогенов на контрольном субстрате и максимальное по сравнению с другими субстратами количество видов, выявленное с помощью световой микроскопии (12 видов), обусловлено равномерностью распределения видов в сообществе. Биопленка контрольного субстрата имела более длительный срок экспозиции по сравнению с биопленками экспериментальных пластин и являлась сбалансированной по видовому составу и функциональному распределению членов сообщества.

По составу доминирующих таксонов сообщества цианобактерий каменистых субстратов были сходны между собой и резко отличались от сообщества стальной пластины. С помощью метагеномного анализа на мраморе, граните, амфиболите и контрольном субстрате выявлено доминирование филогена *Rivularia* sp. (Nostocales). Среди Oscillatoriales,

доминирующих на амфиболите и контрольном субстрате, зарегистрирован филотип *Pseudanabaena*, найденный и при микроскопическом наблюдении биопленок. Среди Chroococcales методами пиросеквенирования и микроскопии на граните, амфиболите и контрольном субстрате выявлен филотип *Chamaesiphon*. На всех каменистых субстратах присутствовали *Oscillatoria* sp., *Limnothrix* sp., *Geitlerinema carotinosum* и филоотипы порядка Pleurocapsales. Наблюдаемые различия видового состава сообществ цианобактерий каменистых субстратов обусловлены минорными филоотипами, представленными в сообществах несколькими последовательностями. На стальной пластине преобладали филоотипы рода *Chamaesiphon* (Chroococcales) и EF580987 (Oscillatoriales). Уникальный филоотип EF580987 может являться видом *H. pusilla*, найденным в большом количестве при микроскопии биопленок искусственного субстрата.

Таблица 1

Показатели видового богатства и разнообразия для сообществ цианобактерий оз. Байкал по данным пиросеквенирования (генетическое расстояние 0,03)

Субстрат/проба	Общее кол-во последовательностей	Кол-во уникальных последовательностей	Кол-во филоотипов	Кoeff. ACE	Кoeff. Chao1
мрамор	5726	1803	35	258	125
гранит	640	265	21	22	22
амфиболит	297	120	28	34	41
контрольный субстрат	970	396	20	27	20
стальная пластина	2194	749	30	153	111
придонная вода	128	62	18	35	28

В придонной воде в отличие от биопленок доминировали представители фил Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria, доля Cyanobacteria составляла менее 3% (рис. 4). Цианобактерии в основном были представлены мелкоклеточными видами порядка Chroococcales.

Параллельно с пиросеквенированием была создана библиотека генов 16S рРНК цианобактерий из биопленок и планктона прибрежных биотопов оз. Байкал. В литорали озера доминировали нанопланктонные Nostocales (55%), представленные родами *Aphanizomenon*, *Dolichospermum* и *Trichormus*, и пикопланктонные цианобактерии порядка Chroococcales (45%). На филогенетическом древе полученные последовательности вместе с последовательностями из базы данных GenBank формировали устойчивые родовые кластеры с высокими значениями статистической поддержки (80-100%).

Известно, что на основе анализа последовательностей гена 16S рРНК цианобактерии группируются друг с другом по сходным экологическим условиям обитания (Ernst *et al.*, 2003). Планктонные цианобактерии из оз. Байкал группировались с представителями из пресных водоемов Европы, Америки и Японии. Цианобактерии-обрастатели кластеризовались с последовательностями из биопленок аналогичных субстратов (например, *Chamaesiphon*), пресных водохранилищ (*Pseudanabaena*), либо формировали отдельные ветви (*Calothrix*, *Leptolyngbya*, *Prochlorothrix*). На основании BLAST-анализа в сочетании с филогенетическим анализом из биопленок гранита и стальной пластины были получены последовательности нового для Байкала рода *Prochlorothrix*, хотя данные пиросеквенирования позволяли говорить только о наличии соответствующего семейства (*Prochlorothrichaceae*).

Следует отметить, что последовательности гена 16S рРНК, полученные при анализе библиотек клонов, дополняют результаты метагеномного анализа. Массив данных пиросеквенирования несравнимо больше и включает в себя почти всю выборку, полученную в результате секвенирования по Сэнгеру. Метагеномный анализ позволяет охарактеризовать значительную часть или все сообщество и оценить его видовое и генетическое разнообразие.

## Глава 5. Азотфиксирующие цианобактерии в озере Байкал

В оз. Байкал ежегодно в августе-сентябре отмечаются периоды, когда содержание азота в фотическом слое воды приближается к аналитическому нулю (Вотинцев и др., 1975; Домышева, 2001). При этом наблюдается высокая численность цианобактерий и водорослей (Белых и др., 2007). В такие периоды значимую роль в функционировании экосистемы приобретают азотфиксирующие цианобактерии.

В ходе работы были изучены морфологические особенности штаммов из коллекции байкальских цианобактерий. На основании размеров клеток, морфологии трихомов, наличия и расположения акинет и гетероцист девять из них были идентифицированы как азотфиксирующий вид *Trichormus variabilis*. Определение последовательностей гена 16S рРНК подтвердило таксономическую принадлежность штаммов к роду *Trichormus*. Данный род и вид ранее не были описаны для оз. Байкал.

Поиск и исследование разнообразия азотфиксирующих цианобактерий в оз. Байкал проводили с помощью анализа маркерного гена нитрогеназы *nifH*. Многочисленные исследования различных водоемов показали, что амплификация гена *nifH* очень удобна для выявления азотфиксирующих видов (Olson *et al.*, 1999; Zani *et al.*, 2000; Zehr *et al.*, 2001; Steppe *et al.*, 2002; и др.). Из проб, отобранных в заливах и прибрежных участках трех котловин, было получено 45 последовательностей фрагмента гена нитрогеназы. Последовательности из Среднего и Северного Байкала входили в кластер родов *Anabaena/Aphanizomenon*, последовательности из Южного Байкала





Представители этих родов характеризуются не только способностью к азотфиксации, которая дает им конкурентное преимущество в период недостатка азота, но и наличием газовых вакуолей, что обеспечивает их плавучесть. В период летнего прогрева воды в прибрежных участках озера наблюдаются оптимальные условия для массового развития цианобактерий.

Из биопленок мрамора, контрольного субстрата и стальной пластины было получено 20 последовательностей гена *nifH*. На основании сравнительного и филогенетического анализа они были отнесены к родам *Anabaena*, *Nostoc* и *Tolypothrix*.

Таким образом, в оз. Байкал азотфиксирующие гетероцистные цианобактерии порядка Nostocales обнаружены в составе как планктонных, так и бентосных сообществ, отмечено их высокое видовое и генетическое разнообразие.

## **Глава 6. Выявление токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области**

Микроцистины – это циклические гептапептиды, обладающие гепатотоксичным и канцерогенным действием. Они синтезируются микроцистин-синтетазой, которая кодируется кластером генов (*mscA-J*). На основе последовательностей *msc*-генов были разработаны праймеры для поиска токсичных представителей.

Выявление генотипов токсичных цианобактерий в водоемах Байкальского региона проводили с помощью набора праймеров, специфичных АМТ-домену *mscE*-гена. Положительный результат в ПЦР-анализе был получен для проб, отобранных в августе 2010 г. в Баргузинском заливе и заливе Куркут (пролив Малое Море). Пробы, отобранные в Братском и Усть-Илимском водохранилищах, давали положительный результат ПЦР во все годы исследования (2005-2010 гг.). Следует отметить, что за весь период мониторинга планктона оз. Байкал на наличие генов синтеза микроцистинов (с 2005 г.) положительный результат получен впервые. В биопленках токсиногенные цианобактерии не обнаружены. Сравнительный и филогенетический анализ полученных последовательностей АМТ-домена *mscE*-гена показал, что в планктоне оз. Байкал, Братского и Усть-Илимского водохранилищ присутствовали цианобактерии родов *Anabaena* и *Microcystis*, содержащие гены синтеза микроцистинов. Представители этих родов часто становятся причиной токсичных «цветений», они известны как основные продуценты микроцистинов в пресных водоемах. Показано, что эвтрофирование водоемов способствует массовому развитию токсичных видов (Chorus, Bartram, 1999). Содержание органических веществ и биогенов в водохранилищах ангарского каскада в несколько раз превышает ПДК вследствие сбросов промышленных и хозяйственно-бытовых сточных вод (Кудринская, Морева, 2004). В Малом Море и Баргузинском заливе в летний

период отмечены высокие значения содержания хлорофилла *a* и биомассы фитопланктона, характерные для мезотрофных водоемов (Белых и др., 2007).

Содержание микроцистинов в воде определяли методом ИФА. В оз. Байкал в исследуемый период микроцистины не обнаружены. В Усть-Илимском водохранилище летом 2010 г. концентрация микроцистинов в воде составила  $0,25 \pm 0,02$  мкг/л, что не превышает ПДК, установленную Всемирной организацией здравоохранения.

Присутствие токсичных генотипов в озере Байкал вызывает большое опасение. Недавно зарегистрирован факт токсичного «цветения» в оз. Котокель, расположенном в 2 км от оз. Байкал и связанном с ним посредством рек (Belykh *et al.*, 2011). Прямая водная связь между озерами Котокель и Байкал представляет определенную угрозу для глубочайшего пресноводного озера мира. Полученные данные говорят о необходимости продолжения мониторинга токсичных цианобактерий в водоемах региона и выработки мер по предупреждению отравлений микроцистинами.

## ВЫВОДЫ

1. В составе цианобактериальных сообществ биопленок литоральной зоны озера Байкал по данным микроскопии определено 16 видов цианобактерий, принадлежащих к 12 родам, 3 порядкам. На мраморе обнаружено 11 видов (9 родов, 3 порядка), на граните 6 видов (5 родов, 3 порядка), на амфиболите 5 видов (4 рода, 3 порядка), на нержавеющей стали 6 видов (5 родов, 3 порядка), на естественном субстрате (контроль) 12 видов (10 родов, 3 порядка). На основе анализа видового состава, морфологии, ультраструктуры клеток и строения биопленок показано, что сообщества цианобактерий в обрастаниях выполняют фототрофную, азотфиксирующую, структурообразующую, адгезивную и защитную функции.
2. В биопленках каменистых субстратов озера Байкал доминируют цианобактерии порядков Nostocales и Oscillatoriales, которые образуют два комплекса видов: «ривулариевый», представленный колониями *Rivularia rufescens* с видами-спутниками *Leptolyngbya rivulariarum* и *Schizothrix rivulariarum* и «толипотриксый» – колонии *Tolypothrix limbata* с видом-спутником *Leibleinia epiphytica*. «Ривулариевый» комплекс развивается на мраморе, граните, амфиболите и плагиограните, «толипотриксый» – на мраморе и плагиограните. В обрастаниях искусственного субстрата доминируют цианобактерии порядков Chroococcales и Oscillatoriales, представленные видами *Chamaesiphon fuscus*, *Ch. subglobosus* и *Heteroleibleinia pusilla*.
3. Фила Cyanobacteria, наряду с Proteobacteria и Bacteroidetes доминирует в составе микробных сообществ биопленок озера Байкал по данным метагеномного анализа. Доля цианобактерий варьирует в зависимости от типа субстрата: цианобактерии преобладают на мраморе и нержавеющей



стали (46% и 41%, соответственно) и являются третьей филой на контрольном субстрате (22%), граните (18%) и амфиболите (8%). Наибольшее видовое разнообразие (по количеству фило типов) определено на мраморе и искусственном субстрате, наименьшее – на граните и контрольном субстрате. В придонной воде, где преобладают Bacteroidetes, Actinobacteria и Proteobacteria, Cyanobacteria является минорной филой (3%).

4. Сообщества нанопланктонных цианобактерий в прибрежных биотопах озера Байкал в летний период характеризуются значительным генетическим разнообразием с доминированием представителей порядка Nostocales (рода *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Nostoc*, *Trichormus*).
5. Показано генетическое разнообразие азотфиксирующих цианобактерий в сообществах биопленок и планктона литорали озера Байкал. В биопленках азотфиксирующие цианобактерии представлены родами *Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Rivularia* и *Tolypothrix*, в планктоне – *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Nostoc* и *Trichormus*. Выявлен новый для Байкала азотфиксирующий род *Trichormus*, представленный видом *Trichormus variabilis*. Описана его морфология и определены последовательности фрагментов генов 16S рРНК и *nifH* девяти штаммов.
6. В Малом Море и Баргузинском заливе, Усть-Илимском и Братском водохранилищах выявлены цианобактерии родов *Anabaena* и *Microcystis*, содержащие гены, кодирующие синтез микроцистинов. В биопленках токсигенные виды отсутствуют. Иммуноферментный анализ планктонных проб в исследуемый период не выявил микроцистины в оз. Байкал, в Усть-Илимском водохранилище концентрация микроцистинов составила  $0,25 \pm 0,02$  мкг/л, что ниже порога, установленного ВОЗ для питьевой воды.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. Азотфиксирующая цианобактерия *Trichormus variabilis* в фитопланктоне озера Байкал / А.С. Гладких, О.И. Белых, И.В. Клименков, И.В. Тихонова // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 6. – С. 814–822.
2. Анализ цианобактерий озера Байкал и Усть-Илимского водохранилища на наличие гена синтеза микроцистина / И.В. Тихонова, О.И. Белых, Г.В. Помазкина, А.С. Гладких // Доклады Академии наук. – 2006. – Т. 409. – № 3. – С. 1–3.
3. Выявление потенциально токсичных цианобактерий в питьевой воде с помощью полимеразной цепной реакции / И.В. Тихонова, А.С. Гладких, О.И. Белых, Е.Г. Сороковикова // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2006. – Т. 2. – № 48. – С. 202–205.
4. Выявление токсичных *Microcystis* в озере Котокельское (Бурятия) / О.И. Белых, И.В. Тихонова, Е.Г. Сороковикова, А.С. Гладких, Ок.В. Калюжная

- // Вестник Томского государственного университета. – 2010. – № 330. – С. 172–175.
5. Метагеномный анализ сообществ микроорганизмов из озера Байкал / **А.С. Гладких**, О.И. Белых, О.В. Левина, В.В. Парфенова // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – Т. 4/1. – № 38. – С. 76–77.
  6. Ecological development and genetic diversity of *Microcystis aeruginosa* from artificial reservoir in Russia / N.A. Gaevsky, V.I. Kolmakov, O.I. Belykh, I.V. Tikhonova, Y. Joung, T.-S. Ahn, V.A. Nabatova, **A.S. Gladkikh** // Journal of Microbiology. – 2011. – V. 49. – № 5. – P. 714–720.

#### **Статьи в сборниках:**

7. Выявление потенциально токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах байкальского региона с помощью молекулярно-биологических методов / И.В. Тихонова, **А.С. Гладких**, Е.Г. Сороковицова, О.И. Белых // Ecology. Scientific Articles. Bulgaria: ScienceVg Publishing, 2007. – Т. 1. – С. 99–106.
8. Обнаружение токсичных цианобактерий в хозяйственно важных водоемах Сибири, Белоруссии и Украины / Е.Г. Сороковицова, О.В. Калюжная, И.В. Тихонова, **А.С. Гладких**, С.А. Потапов, О.И. Белых // Сборник статей молодых ученых Иркутского научного центра Сибирского отделения РАН. – Иркутск: Изд-во Института географии им. Б.В. Сочавы СО РАН, 2011. – С. 34–36.

#### **Методические пособия:**

9. Руководство по определению биомассы видов планктона пелагиали озера Байкал / О.И. Белых, А.Ю. Бессудова, **А.С. Гладких**, А.Е. Кузьмина, Г.В. Помазкина, Г.И. Поповская, Е.Г. Сороковицова, И.В. Тихонова, М.В. Усольцева // Методическое пособие. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2011. – 51 с.

#### **Материалы конференций:**

10. Белых О.И. Выявление генов синтеза токсинов у цианобактерий озера Байкал и водоемов Байкальского региона / О.И. Белых, Е.Г. Сороковицова, **А.С. Гладких** // Новые технологии в интегративной биологии и медицине: материалы межд. науч. междисципл. семинара. Паттайя, 2006. – С. 11–12.
11. Выявление генетических маркеров токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области: молекулярно-биологический подход к оценке качества воды / О.И. Белых, И.В. Тихонова, **А.С. Гладких**, Г.В. Помазкина // Озерные экосистемы: Биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды: материалы III междунар. науч. конф. Минск-Нарочь, 2007. – С. 305–306.
12. Выявление генов синтеза токсинов цианобактерий из водоемов Иркутского региона / **А.С. Гладких**, И.В. Тихонова, О.И. Белых, Г.В. Помазкина // Экология 2007: материалы междунар. молод. конф. Архангельск, 2007. – С. 158–159.
13. Выявление генов синтеза токсинов цианобактерий в водоемах Иркутского региона / О.И. Белых, **А.С. Гладких**, И.В. Тихонова, Г.В. Помазкина //

- Современные проблемы водохранилищ и их водосборов: материалы междунар. науч.-практич. конф. Пермь, 2007. – Т. 2. – С. 204–207.
14. Выявление генов синтеза цианобактериальных токсинов в различных водоемах России: молекулярно-биологический подход к оценке качества воды / О.И. Белых, **А.С. Гладких**, И.В. Тихонова, О.А. Дмитриева // Материалы X съезда гидробиол. об-ва РАН. Владивосток, 2009. – С. 39–40.
  15. Выявление токсичных цианобактерий в водоемах Байкальского региона / О.И. Белых, Е.Г. Сороковикова, И.В. Тихонова, **А.С. Гладких**, С.А. Потапов // Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды: материалы IV междунар. науч. конф. Минск-Нарочь, 2011. – С. 158.
  16. Выявление токсичных цианобактерий в озере Байкал и водохранилищах Иркутской области / **А.С. Гладких**, О.И. Белых, И.В. Тихонова, Г.В. Помазкина, Е.Г. Сороковикова // Биоразнообразие экосистем внутренней Азии: материалы всерос. науч. конф. Улан-Удэ, 2006. – Т. 2. – С. 31–32.
  17. **Гладких А.С.** Выявление токсичного вида цианобактерий *Microcystis aeruginosa* в Берешском водохранилище / **А.С. Гладких**, О.И. Белых, И.В. Тихонова // Проблемы молекулярной и клеточной биологии: сборник материалов молод. науч.-методич. конф. Томск, 2007. – С. 57–58.
  18. **Гладких А.С.** Молекулярно-биологические методы в изучении цианобактерий озера Байкал и водохранилищ / **А.С. Гладких**, И.В. Тихонова, О.И. Белых // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ: материалы II Байкальского микробиол. симпозиума с междунар. участием. Иркутск, 2007. – С. 50–51.
  19. **Гладких А.С.** Цианобактерии озера Байкал и водохранилищ Иркутской области: видовой состав и выявление токсичных видов / **А.С. Гладких**, О.И. Белых, И.В. Тихонова // Ежегодная науч.-теоретич. конф. аспирантов и студентов ИГУ: Вестник Иркутского ун-та. Иркутск, 2007. – С. 11–12.
  20. Исследование микробных сообществ в планктоне и биопленках озера Байкал методом пиросеквенирования / В.В. Парфенова, О.И. Белых, **А.С. Гладких**, Т.Я. Косторнова, М.Ю. Сулова // Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний: материалы междунар. конф. Улан-Удэ – Улан-Батор, 2011. – С. 142–143.
  21. Сороковикова Е.Г. Выявление генов синтеза токсинов у цианобактерий Байкальского региона / Е.Г. Сороковикова, И.В. Тихонова, **А.С. Гладких** // V конф. мол. уч. СО РАН, посвященная М.А. Лаврентьеву. Сборник статей. Новосибирск, 2007. – С. 168–170.
  22. Токсичные цианобактерии оз. Байкал и водоемов Байкальского региона / **А.С. Гладких**, О.И. Белых, И.В. Тихонова, Е.Г. Сороковикова, С.А. Потапов // Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах: материалы III Байкальского микробиол. симпозиума. Иркутск, 2011. – С. 39–41.
  23. Analysis of cyanobacterial community of artificial substrate biofilm and plankton in Lake Baikal / O.I. Belykh, **A.S. Gladkikh**, E.G. Sorokovikova, I.V.

- Tikhonova, V.V. Parfenova // Abstracts of the 4<sup>th</sup> congress of the European microbiologists, FEMS 2011. Geneva, 2011. – P. 1038.
24. Belykh O.I. Detection of microcystin synthetase genes in the different water basins of Russia / O.I. Belykh, **A.S. Gladkikh**, I.V. Tikhonova / Abstracts of the 5<sup>th</sup> international symposium Speciation in Ancient Lakes, SIAL V. Ohrid, 2009. – P. 9–10.
25. **Gladkikh A.** Detection of microcystin synthetase genes in cyanobacteria from Lake Baikal and water reservoirs of East Siberia / **A. Gladkikh**, I. Tikhonova, O. Belykh // Society for general microbiology meeting: abstracts of spring meeting. Edinburgh, 2008. – P. 65.
26. **Gladkikh A.** Test of presents toxic cyanobacteria in lake Baikal and water reservoirs of region / **A. Gladkikh**, I. Tikhonova, O. Belykh // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: abstracts of the III international young scientists conference. Odesa, 2007. – P. 187–188.
27. Detection of toxic cyanobacteria in Lake Baikal and water bodies of the region / O.I. Belykh, E.G. Sorokovikova, I.V. Tikhonova, **A.S. Gladkikh**, S.A. Potapov // Abstracts of the 4<sup>th</sup> congress of the European microbiologists, FEMS 2011. Geneva, 2011. – P. 949.
28. Toxic cyanobacteria in water bodies of Baikal region (East Siberia, Russia) / **A.S. Gladkikh**, O.I. Belykh, E.G. Sorokovikova, I.V. Tikhonova, S.A. Potapov // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution: abstracts of the IV international young scientists conference. Odesa, 2011. – P. 212–213.