

На правах рукописи



СУХАНОВА Елена Викторовна

**СООБЩЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ
С ЛОСОСЕВИДНЫМИ РЫБАМИ 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

Белькова Наталья Леонидовна

Научный консультант: кандидат биологических наук

Дзюба Елена Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,

Чхенкели Вера Александровна

кандидат биологических наук

Данилова Эржена Викторовна

Ведущая организация: Институт водных и экологических
проблем ДВО РАН

Защита диссертации состоится 15 марта 2012 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 666003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, ауд. 219.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИГУ по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Бульвар Гагарина, 24.

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел. / факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.
Автореферат разослан 08 февраля 2012 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук,
доцент

А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Согласно многочисленным исследованиям в области микробной экологии, большинство бактерий в природных экосистемах существуют в сообществах, так как это облегчает доступ питательных веществ, способствует метаболической кооперации организмов и защищает клетки от негативного воздействия окружающей среды. Ассоциированная микрофлора присутствует в различных органах и тканях рыб, а ее качественные и количественные характеристики часто отражают характерные особенности окружающей среды.

В последнее время усилился интерес исследователей к микрофлоре кишечного тракта (КТ) рыб (Кузьмина, 2005; Извекова и др., 2007; Austin, 2002 и др.). Благодаря этим работам утвердилось представление, что она является жизненно необходимым компонентом КТ, зависящим от возраста, типа питания и экологических условий местообитания рыб. Исследование разнообразия кишечной микрофлоры рыб позволяет классифицировать микроорганизмы как автохтонные или собственные, и как аллохтонные или транзиторные. Специфичная кишечная микрофлора состоит из аэробных, факультативных и облигатных анаэробных бактерий.

Филогенетическая идентификация отдельных микроорганизмов в сообществах без культивирования является мощным инструментом в комплексном изучении микрофлоры рыб, так как с помощью этих методов можно получить характеристику видового состава всей ассоциированной микрофлоры, включая и некультивируемые бактерии. В настоящее время молекулярными методами получены нуклеотидные последовательности фрагментов гена малой субъединицы рибосомной РНК (16S рРНК) представителей рода *Mycoplasma* непосредственно из КТ различных видов рыб (Holben *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2005; Vano *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009). Функциональное значение этих прокариотических организмов пока не установлено, но авторы предполагают, что микоплазмы могут являться составной и неотъемлемой частью кишечной микрофлоры рыб.

Микрофлора рыб и разнообразие ихтиопатогенов водоемов и водотоков Восточной Сибири недостаточно изучены. Известно, что районными ветеринарными станциями проводятся микробиологические исследования, основная задача которых – определить основные этиологические агенты инфекционных болезней рыб (Хандажапова и др., 2005; Цыбиков и др., 2009). В последнее время периодически возникают вспышки заболеваний рыб в заливах Байкала, озерах Республики Бурятия и Ивано-Арахлейской водной системы, которые приводят к их массовой гибели (Елизов, 2006; Михеев, Матюгина, 2010).

Цель исследования – изучить состав, структуру и разнообразие микробных сообществ, ассоциированных с лососевидными рыбами озера Байкал и некоторых водоемов Восточной Сибири.

Задачи исследования:

1. Определить доминирующие генотипы микроорганизмов и провести сравнительный молекулярно-генетический анализ разнообразия кишечной микрофлоры лососевидных рыб с разной пищевой стратегией на примере байкальского омуля и представителей рода *Thymallus*.
2. Охарактеризовать *Mycoplasma* sp. как специфического представителя микробного сообщества кишечника черного байкальского хариуса, с помощью комплекса молекулярно-генетических, микроскопических и серологических методов и оценить распространение этого микроорганизма в различных видах лососевидных рыб.
3. Определить доминирующие генотипы и генетическое разнообразие сообществ микроорганизмов, ассоциированных с язвенными поражениями внешних покровов рыб в аквариумных экспозициях и естественных водоемах Восточной Сибири.

Научная новизна. Впервые определён спектр доминирующих генотипов в кишечной микрофлоре байкальского омуля и черного байкальского хариуса, среди которых присутствуют бактерии, относящиеся к автохтонной и аллохтонной микрофлоре. Показано, что основной состав таксономических групп у омуля и хариуса одинаков, однако у рыб рода *Thymallus* дополнительно детектируются представители филы Spirochaetes и *Mycoplasma* sp. Впервые в составе кишечной микрофлоры черного байкальского и ленского хариусов определены генотипы *Brevinema* sp. и *Mycoplasma* sp. Установлено, что заболевания внешних покровов рыб из аквариумных экспозиций и естественных водоемов Восточной Сибири вызваны ассоциациями микроорганизмов, определены генотипы доминирующих ихтиопатогенов.

Практическая значимость полученных результатов. Разработан комплекс методов, позволяющих быстро и корректно проводить идентификацию и детекцию микроорганизмов, ассоциированных как с внешними покровами, так и с внутренними органами рыб.

Изучено разнообразие ассоциированной микрофлоры некоторых представителей подотряда лососевидных рыб (Salmonoidei), в который входят ценные промысловые виды, использующиеся для акклиматизации в различных водоемах и являющиеся объектами искусственного воспроизводства. Результаты исследования могут быть использованы для контроля и коррекции питания рыб в аквакультуре.

Поставлены методы детекции байкальского генотипа *Mycoplasma* на разработанных генотип-специфичных праймерах на ген 16S рРНК и район ITS. Полученные результаты могут быть востребованы при выявлении генотипа *Mycoplasma* в гидробионтах.

Определены генотипы региональных ихтиопатогенов, детекция которых необходима для профилактики и терапии заболеваний рыб, особенно в условиях аквакультуры. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов рибосомных генов могут быть использованы для разработки групп- и видо-специфичных праймеров и зондов для быстрой детекции

бактерий, вызывающих заболевания внешних покровов рыб естественных и искусственных популяций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Состав аллохтонной микрофлоры кишечника рыб специфичен для мест обитания и в значительной степени определяется разнообразием сообществ микроорганизмов воды. Автохтонная микрофлора кишечника рыб более видоспецифична.
2. *Mycoplasma* sp. – специфичный представитель автохтонной микрофлоры некоторых видов лососевидных рыб Байкальского региона.
3. Использование молекулярно-генетических методов для определения состава сообществ микроорганизмов, ассоциированных с язвенными поражениями внешних покровов рыб, является решением проблемы детекции инфекционных агентов, вызывающих эти заболевания.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы представлены на международных и российских конференциях и симпозиумах: Всероссийской конференции молодых ученых «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи» (Улан-Удэ, апрель 2007 г.); молодёжной научной конференции «Молодёжь и наука Забайкалья» (Чита, декабрь 2008 г.); II Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия - 2009» (Пермь, май 2009 г., диплом I степени); The 13th Symposium for Biology Student of Europe «SymBioSe 2009» (Kazan, July–August 2009); Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 90-летию со дня рождения академика П.Л. Горчаковского «Экология: от южных гор до северных морей» (Екатеринбург, апрель 2010 г.); III Всероссийском конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия-2010» (Нижний Новгород, май 2010 г.); Всероссийской конференции с международным участием «V Верещагинской байкальской конференции» (Иркутск, октябрь 2010 г., диплом I степени); IV Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия - 2011» (Воронеж, май 2011 г., диплом I степени).

Публикации. По результатам исследования опубликована 31 научная работа, из них 7 – статьи, из которых 6 из списка ВАК, 1 – глава в монографии, 1 – методическое пособие и 22 – тезисы конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 138 страницах, содержит 5 таблиц и 18 рисунков. Список литературы включает 232 наименования, из которых 57 – российских и 175 – зарубежных изданий.

Реализация и внедрение результатов исследования. Теоретические положения, результаты исследований и рекомендации использованы при подготовке научно-исследовательских отчетов по следующим проектам: бюджетной теме № VI.51.1.9 (рук. Парфенова В.В., гос. рег. № 01201052128); гранта РФФИ-Байкал № 05-04-97221 (рук. Дзюба Е.В.); Программе РАН № 27.13 (рук. Дзюба Е.В.); инновационному проекту СО РАН (рук. Белькова Н.Л.) и Государственному контракту № 16.512.11.2075 (рук. Дзюба Е.В.).

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н., доценту Н. Л. Бельковой и научному консультанту к.б.н. Е. В. Дзюба за помощь в организации и проведении исследований. За оказанную помощь при выполнении работ и обсуждении результатов благодарю сотрудников отдела микробиологии, лабораторий ихтиологии, аналитической биоорганической химии, геносистематики и отдела ультраструктуры клетки Лимнологического института СО РАН. Отдельную благодарность выражаю заведующей Центром лабораторной диагностики «Мечников» (ИГМУ, Иркутск) Г.Ю. Коган и сотруднику Т.И. Никифоровой, а также заведующей центром по микоплазмам д.б.н. И.В. Раковской и сотрудникам центра ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» (г. Москва) за оказанную помощь в работе по изучению микоплазм. Выражаю благодарность Н.А. Докучаеву (с. Петропавловское, Киренский район) и главному ветеринарному врачу Киренского района Х.Х. Эрбиеву за помощь в сборе материала на реке Чечуй (бассейн реки Лена). Особую благодарность приношу своим родным за моральную и финансовую поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы приведены современные сведения о разнообразии кишечной микрофлоры разных видов рыб и проведен анализ методических подходов, используемых для изучения микробных сообществ. Показана роль симбионтной микрофлоры, населяющей КТ рыб. Приведены данные о микроорганизмах с неустановленным функциональным значением, которых детектируют в КТ разных организмов, в том числе и рыб. Дана характеристика инфекционных заболеваний внешних покровов рыб, вызываемых микроорганизмами. Описана этиология инфекционных заболеваний рыб оз. Байкал и озёр Забайкалья. Отдельная подглава посвящена особенностям экологии лососевидных рыб Байкальского региона с разной пищевой стратегией.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования послужили представители лососевидных рыб: родов *Thymallus* (из озер Байкал, Тухурен-Нур, Хубсугул; рек Ангара, Чечуй, Большая Тира; аквариумной экспозиции Байкальского музея ИНЦ СО РАН); *Coregonus* (оз. Байкал, р. Чечуй); *Prosopium*, *Brachymystax* (р. Чечуй). Для отработки методов использовали *Perca fluviatilis* (оз. Арахлей) и *Lota lota* (оз. Хубсугул).

Молекулярно-генетические методы использовали для изучения разнообразия микробных сообществ, ассоциированных с КТ и внешними покровами рыб. Для селективной инактивации ДНК мертвых клеток использовали обработку моноазидом этидия (ЭМА). Выделение суммарной ДНК из биологического материала проводили тремя методами: с помощью

коммерческих наборов ДНК-сорб В и РИБО-сорб (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва), методом модифицированной очистки с цетилтриметиламмония бромидом (Грачев и др., 2006) и методом ферментативного лизиса с фенол-хлороформной экстракцией (Белькова, 2004). Выделение плазмидной ДНК с исследуемым фрагментом проводили коммерческим набором AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, США).

Аmplификацию фрагментов рибосомных генов проводили с использованием реагентов фирмы «НТИ-Байкал» на термоциклерах: Techne (Progene, Англия); BioRad (США) и Бис (Россия). Использовали консервативные праймеры на 16S рДНК на основные домены Bacteria и Archaea. Для изучения состава микробных сообществ проводили групп-специфичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) на основные филы бактерий: Firmicutes, Cyanobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Bacteroidetes, Spirochaetes. Кроме того, детектировали виды *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Bacillus licheniformis* и *Mycoplasma* sp. байкальского генотипа.

Ампликоны, полученные на праймерах EUB500L–1350R (Денисова и др., 1999), SPI46L–EUB500R, SPI46L–EUB1350R (Paster *et al.*, 1996), BLS342L–EUB1350R (Blackwood *et al.*, 2005) и Muc2L–Muc23S (собственные данные), лигировали в вектор GeneJET™ (GeneJET™ PCR Cloning Kit, Fermentas, Литва). Компетентные клетки *Escherichia coli* (штаммы XL-1 и DH-5L) получали, используя методику трансформации CaCl₂-зависимых клеток (Sambrook *et al.*, 1989).

Детекцию генотипа *Mycoplasma* в кишечной микрофлоре рыб проводили с использованием пар генотип-специфичных праймеров Muc1L–Muc1R и Muc2L–Muc2R и набора реагентов с неспецифической детекцией SybrGreen (BioRad, США) на приборе Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research, Австралия).

Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматических секвенаторах Beckman Coulter CEQ 8800, ABI310A и ABI 3130xl (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, США). Дальнейшую обработку данных выполняли с использованием программных ресурсов FASTA, BLAST, Pintail, Clustal W 2.0.10, построение филогенетических деревьев – Mega v.3.0 и v.5.0, MrBayes 3.1.2. Полученные последовательности (199 шт.) зарегистрированы в EMBL банке данных под номерами: FM897198–FM897210, AM492686–AM492690, FR799624–FR799684, HE565972–HE566044, HE586939–HE586962, HE589594–HE589602, HE584724–HE584737.

Морфологию клеток микоплазм (KM) в кишечнике черного байкальского хариуса исследовали с помощью **трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ)**. Образцы фиксировали по стандартной методике, серийные срезы делали на микротоме Ultracut R (Leica, Австрия). Ультратонкие срезы визуализировали на просвечивающем электронном микроскопе Leo 906E (Zeiss, Германия) без предварительного контрастирования. На микрофотографиях размер KM определяли в программе Image-Pro Plus 6.0.

Для обнаружения и полуколичественной оценки титра КМ в кишечнике черного байкальского хариуса использовали тест-системы на *Mycoplasma hominis* «Микоплазма-50», а для определения чувствительности/устойчивости к антибиотикам – «Микоплазма-АЧ-12» (ФГУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). Выделение культуры микоплазмы из органов проводили с помощью селективных сред. Серологические методы использовали для определения антигена (Аг) и антител (Ат) к *M. hominis* в органах и тканях рыб.

ГЛАВА 3. ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ БАЙКАЛЬСКОГО ОМУЛЯ И ХАРИУСА (*THYMALLUS*)

3.1. Разнообразие кишечной микрофлоры байкальского омуля

Результаты амплификации и клонирования ДНК проб КТ байкальского омуля (*Coregonus migratorius*) пелагической морфо-экологической группы (МЭГ) продемонстрировали доминирование в кишечной микрофлоре в весенний период представителей трех фил бактерий: Proteobacteria, Bacteroidetes и Actinobacteria.

Необходимо отметить ближайших родственников сем. Enterobacteriaceae филы Proteobacteria, среди которых описаны факультативные и облигатные анаэробы и типичные представители кишечной микрофлоры гомойотермных и пойкилотермных животных. Были получены последовательности представителей родов *Salmonella* и *Enterobacter*, ближайшие некультивируемые гомологи которых описаны в пробах КТ личинок насекомых (FJ593711, FJ593713, *Rothschildia lebeau*). Известно, что некоторые виды рода *Salmonella* являются патогенными и вызывают сальмонеллез у гомойотермных животных. Ранее в кишечной микрофлоре рыб представителей этого рода не обнаруживали, но их считают нормальной микрофлорой для пойкилотермных и гомойотермных животных. Другим типичным представителем кишечной микрофлоры этих животных являются представители рода *Enterobacter*. Они были идентифицированы различными методами в КТ разных видов рыб (Kim *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009; Holben *et al.*, 2002).

Бактерии рода *Pseudomonas* (сем. Pseudomonadaceae) являются наиболее распространенными в разнообразных местах обитания. Физиологическим свойством псевдомонад является микроаэрофильность, благодаря чему они способны выживать в бескислородных условиях. Бактерии рода *Pseudomonas* широко представлены в воде и в осадках озера Байкал, они составляют большую долю культивируемых гетеротрофных микроорганизмов (Павлова и др., 2003; Парфенова и др., 2006). В ДНК из проб КТ байкальского омуля определено 11 последовательностей, имеющих высокую гомологию с *Pseudomonas* sp., *P. putida*, *P. stutzeri* и *P. proteolytica*. Только последовательность клона O25-24 имеет среди ближайших родственников штамм *Pseudomonas* sp. (HM352366) из кишечника *Helicoverpa armigera*. По данным литературы, представители рода *Pseudomonas* являются одной из

доминирующих культивируемых групп микроорганизмов, изолируемых из кишечника различных видов рыб (Austin, 2002; Holben *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Navarrete *et al.*, 2009).

Другие представители филы Proteobacteria – *Stenotrophomonas* sp., *Pseudoalteromonas* sp., *Comamonas* sp. и *Quatrionicoccus* sp. – аэробные микроорганизмы. Представители родов *Comamonas*, *Pseudoalteromonas* и *Stenotrophomonas* – широко распространенные виды, детектированы молекулярно-генетическими методами в кишечнике рыб (Bano *et al.*, 2007; Navarrete *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2008). Функциональную роль этих микроорганизмов в кишечной микрофлоре определить в настоящее время затруднительно, учитывая особенности их физиологии.

3.2. Разнообразие кишечной микрофлоры рыб рода *Thymallus*

Молекулярно-генетический анализ кишечной микрофлоры черного байкальского (*Thymallus baicalensis*) и ленского (*Th. baicalolenensis*) хариусов из всех проанализированных мест обитания выявил доминирование представителей двух фил бактерий (Proteobacteria и Tenericutes). Кроме того, в КТ хариусов детектированы представители фил Spirochaetes (р. Ангара, оз. Тухурен-Нур, р. Чечуй), Firmicutes (р. Большая Тира) и Bacteroidetes (оз. Тухурен-Нур), а также порядка Diplomonadida (р. Ангара).

Для хариусов Байкала и Ангары определены последовательности, имеющие высокую гомологию с таковыми из кишечной микрофлоры байкальского омуля (*Comamonas*, *Stenotrophomonas* и *Pseudomonas*). Это может быть связано с их присутствием в байкальской воде или в ассоциациях с общими кормовыми объектами.

Кроме вышеперечисленных, к аллохтонной микрофлоре КТ черного байкальского хариуса из оз. Байкал следует отнести представителей класса Alphaproteobacteria *Bradyrhizobium* sp. и *Azospirillum* sp., ближайшие культивируемые родственники которых выделены из ассоциаций с растениями и пресных вод. *Collimonas* sp. (класс Betaproteobacteria, сем. Oxalobacteraceae), выявленный в кишечнике ленского хариуса из р. Большая Тира, является строгим аэробом, поэтому также может быть отнесен к аллохтонной микрофлоре.

Разнообразие микроорганизмов, которые могут быть отнесены к автохтонным, варьирует у хариусов из разных мест обитания. В кишечной микрофлоре хариуса оз. Байкал определены ближайшие родственники *Caulobacter* sp. и *Sphingomonas* sp. (класс Alphaproteobacteria), которые имеют высокую гомологию с некультивируемыми бактериями, выделенными из кишечной микрофлоры различных организмов. Нуклеотидная последовательность клона O1-10 имеет ближайшего культивируемого родственника *Delftia* sp. (HM587796; класс Betaproteobacteria, сем. Comamonadaceae) из кишечника термитов. Известные представители этого рода *D. tsuruhatensis* и *D. lacustris* способны разрушать пептидогликан и проявляют хитиназную активность (Jorgensen *et al.*, 2009).

К собственной кишечной микрофлоре хариусов оз. Байкал следует отнести представителей родов *Enterobacter* и *Salmonella*, которые идентичны таковым из кишечника байкальского омуля, а также *Escherichia* (класс Gammaproteobacteria, сем. Enterobacteriaceae), имеющие высокую гомологию (99%) с микроорганизмами, культивированными из кишечника насекомых (HQ407235, HQ154567). Следует отметить, что последовательности *E. coli* были получены в результате молекулярно-генетического анализа слизистой кишечника радужной форели (Kim *et al.*, 2007). Еще один представитель класса Gammaproteobacteria имеет ближайшего культивируемого родственника *Aeromonas salmonicida* (GQ266405, сем. Aeromonadaceae) с гомологией 100%, выделенного из культивированного пресноводного атлантического лосося при атипичном фурункулезе. Близкие некультивируемые родственники (FR853718) также получены молекулярными методами из белого амура (*Stenopharyngodon idellus*). По данным литературы, в кишечной микрофлоре многих видов рыб отмечено присутствие бактерий рода *Aeromonas* (Holben *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Vano *et al.*, 2007). Кроме того, известно, что вид *A. salmonicida* является психрофильным ихтиопатогеном и вызывает различные инфекции в природных и искусственных популяциях рыб.

Кроме представителей родов *Enterobacter* и *Mycoplasma*, в КТ черного байкальского хариуса из аквариумной экспозиции определена последовательность бактерии рода *Acinetobacter* (сем. Moraxellaceae). Представителей рода *Acinetobacter* детектировали в кишечной микрофлоре многих видов рыб (Holben *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2007; Shiina *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008; Navarrete *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009).

В кишечнике черного байкальского хариуса из озера Тухурен-Нур (Восточные Саяны) определены последовательности бактерий рода *Deefgea* (класс Betaproteobacteria, сем. Neisseriaceae), ближайший родственник которых детектирован молекулярными методами в кишечной микрофлоре радужной форели (Huber *et al.*, 2004). Вместе с тем детектирована последовательность, ближайший некультивируемый родственник которой имеет гомологию 96% (FJ456666; класс Deltaproteobacteria) и выделен из кишечника антарктических рыб (Ward *et al.*, 2009), а ближайший культивируемый родственник *Lawsonia intracellularis* (сем. Desulfobacteriaceae) – 86% и является внутриклеточным кишечным симбионтом (Gebhart *et al.*, 1993).

В кишечнике ленского хариуса из реки Большая Тира, кроме представителей рода *Aeromonas*, определены последовательности бактерий рода *Plesiomonas* (класс Gammaproteobacteria, сем. Enterobacteriaceae). Один из видов этого рода – *Plesiomonas shigelloides* детектирован различными методами в кишечниках рыб (Holben *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006; Austin, Austin, 2007).

Следует отметить еще две крупные таксономические группы, представители которых также могут быть отнесены к собственной микрофлоре хариусов: фила Firmicutes (р. Большая Тира) и фила Bacteroidetes

(оз. Тухурен-Нур). Последовательности клонов Н98-05 и Н98-11 имеют гомологию с *Clostridium* sp. (фила Firmicutes, сем. Clostridiaceae). По данным литературы, в кишечной микрофлоре рыб детектировали представителей рода *Clostridium* молекулярно-генетическими методами и культивированием (Holben *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Последовательность клона Х9-11 идентична *Flavobacterium* sp. (фила Bacteroidetes, сем. Flavobacteriaceae). Ранее бактерии этого рода культивировали и детектировали молекулярно-генетическими методами из КТ различных видов рыб (Ringo *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009). Флавобактерии нетребовательны к кислороду, выживают в микроаэрофильных и анаэробных условиях, а некоторые виды являются патогенными для рыб.

Следующей крупной таксономической группой, детектируемой во всех рыбах рода *Thymallus*, являются представители филы Tenericutes. Ближайшие родственники – последовательности некультивируемых микоплазм (класс Mollicutes, сем. Mycoplasmataceae) – получены в результате клонирования ампликонов ДНК из КТ антарктических рыб *Notothenia coriiceps* (Ward *et al.*, 2009) и «шотган»-секвенирования мРНК радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (EZ764760), а ближайший культивируемый родственник с гомологией 95% – *Mycoplasma moatsii*. Ранее микоплазмы были детектированы молекулярно-генетическими методами в КТ различных видов рыб (Holben *et al.*, 2002; Shiina *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Vano *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009).

Дополнительно к вышеперечисленным микроорганизмам в хариусах из рек Ангара и Чечуй, а также озера Тухурен-Нур были детектированы представители филы Spirochaetes. Последовательности, определенные в анализе ДНК проб КТ хариусов рек Ангара и Чечуй, имеют гомологию 93–95% с некультивируемыми спирохетами, выделенными из кишечника различных видов рыб (Shiina *et al.*, 2006; Vano *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009), и 90% с последовательностью типового штамма *Brevinema andersonii* (L31543, сем. Brevinemataceae). Последовательности ДНК проб КТ хариуса из озера Тухурен-Нур отличаются от байкальских, ближайший культивируемый родственник – *Spiroseta culicis* (AF166259). Спирохеты – известные патогенные микроорганизмы, в последнее время все чаще детектируются в КТ различных пойкилотермных и гомойотермных животных, что позволяет предполагать их функциональную значимость для хозяев.

Кроме прокариот, в кишечнике черного байкальского хариуса из р. Ангара детектирован одноклеточный эукариот сем. Hexamitidae – *Spiroucleus barkhanus*. Филогенетический анализ продемонстрировал близость байкальских представителей (AM492686–AM492689) к непатогенному генотипу *S. barkhanus*, выделенному из *Salvelinus alpinus* (AY646679), *Thymallus arcticus* (DQ273887) и *Th. thymallus* (DQ186576). Данный организм локализуется в желчном пузыре и переднем отделе кишечника хозяина. Эти жгутиковые простейшие являются комменсалами рыб, не вызывают заболеваний. Патогенный генотип *S. barkhanus* (син.

Spiroucleus salmonicida n. sp.), выделенный из *S. alpinus* (AY677181) и *Salmo salar* (DQ186594), образует отдельный кластер.

3.3. Сравнительная характеристика кишечной микрофлоры лососевидных рыб

Групп-специфичная ПЦР не выявила особенных отличий в структуре микробных сообществ кишечной микрофлоры омуля трех МЭГ в весенний период (рис. 1А). Детектирован одинаковый спектр следующих таксономических групп: Proteobacteria (классы Alpha и Beta), Actinobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes и Firmicutes. В осенний период у омуля прибрежной МЭГ сохраняется такой же широкий спектр таксонов, в то время как у омуля придонно-глубоководной МЭГ разнообразие существенно ниже. Известно, что сезонные изменения в питании омуля, обитающего в прибрежной зоне озера, где состав кормовой базы варьирует вследствие изменчивости абиотических условий среды, выражены наиболее заметно. Придонно-глубоководный омуль в течение всего года обитает на значительных глубинах, где условия среды более стабильны. В его рационе сезонные изменения выражены незначительно.

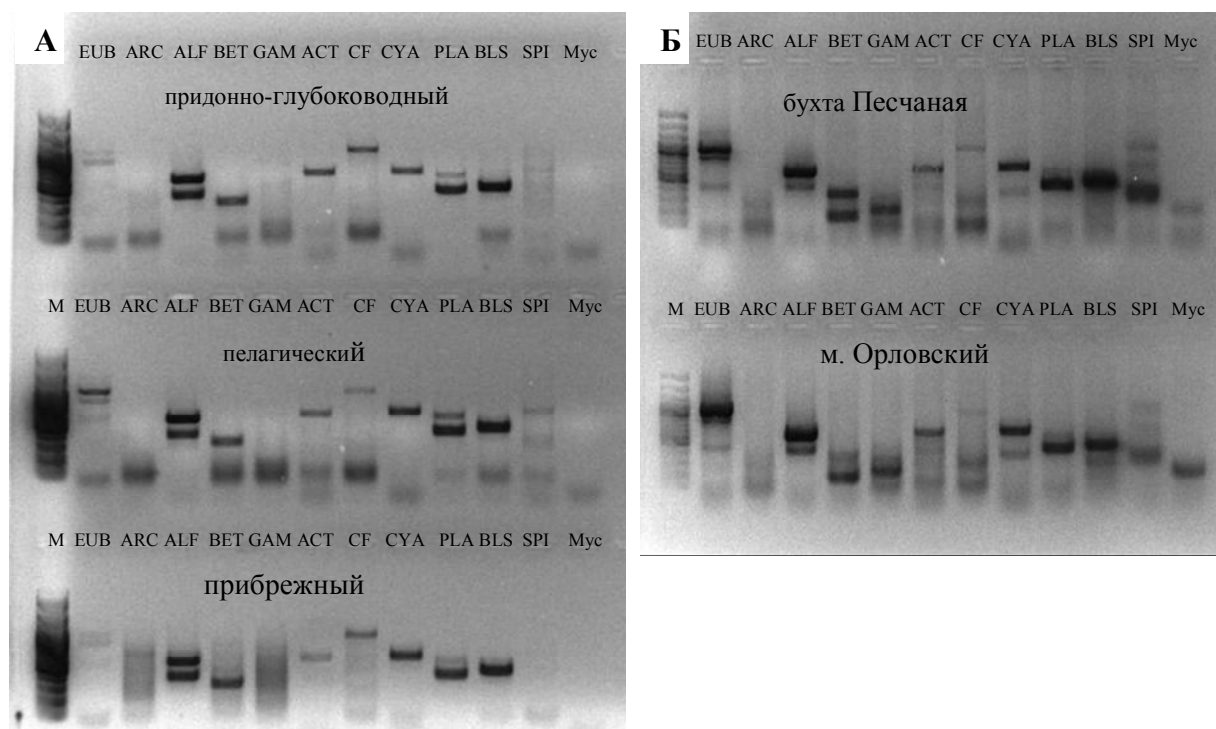


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов с суммарной ДНК, выделенной из кишечника байкальского омуля разных МЭГ (А) и черного байкальского хариуса (Б) оз. Байкал в весенний период на групп-специфичных праймерах: EUB – универсальные на ген 16S рРНК (900 п.н.); ARC – Archaea (600 п.н.); ALF – класс Alphaproteobacteria (400 п.н.); BET – класс Betaproteobacteria (350 п.н.); GAM – класс Gammaproteobacteria (800 п.н.); ACT – фила Actinobacteria (640 п.н.); CF – фила Bacteroidetes (1050 п.н.); CYA – фила Cyanobacteria (650 п.н.); PLA – фила Planctomycetes (420 п.н.); BLS – фила Firmicutes (400 п.н.); SPI – фила Spirochaetes (500 п.н.); Мус – байкальский генотип *Mycoplasma* (150 п.н.); М – маркер молекулярного веса.

Постоянство поступающих извне питательных компонентов предполагает развитие кооперации или специализации среди

микроорганизмов, уменьшение конкуренции за питательные ресурсы, следовательно, уменьшение числа таксономических единиц в микробном сообществе, как это наблюдается в составе кишечной микрофлоры омуля придонно-глубоководной МЭГ. Переход макроорганизма на другой тип питания сопровождается изменением пищевого спектра, появлением новых пищевых компонентов и, как следствие, увеличением разнообразия микроорганизмов, это подтверждается результатами анализа микрофлоры КТ осенних популяций омуля прибрежной и придонно-глубоководной МЭГ.

Изучение кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса из озера Байкал в весенний период с помощью групп-специфичной амплификации показало, что основной спектр таксономических групп совпадает с таковым у байкальского омуля в тот же период, дополнительно детектированы представители филы *Spirochaetes* и байкальский генотип *Mycoplasma* (рис. 1Б). Показано, что отличительной особенностью состава кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса из аквариумной экспозиции является невысокий спектр доминирующих групп микроорганизмов и отсутствие аэробных форм, которые можно было бы с уверенностью классифицировать как привнесенную, аллохтонную микрофлору. Несомненно, это вызвано регулярной дезинфекцией воды в аквариумах, предотвращающей рост широко распространенных водных гетеротрофных микроорганизмов, и специфичностью питания рыб (замороженный рыбный фарш).

ГЛАВА 4. МИКОПЛАЗМЫ – СПЕЦИФИЧНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ МИКРОФЛОРЫ РЫБ РОДА *THYMALLUS*

4.1. Детекция и распространение генотипа *Mycoplasma*

Искомый генотип детектирован во всех проанализированных образцах представителей рода *Thymallus* и в некоторых – *Coregonus*, *Prosopium* и *Brachymystax* из не сообщающихся водных бассейнов Восточной Сибири (табл. 1). Можно предположить, что байкальский генотип *Mycoplasma* относится к нормальной симбиотической интестинальной микрофлоре проанализированных видов рыб, поскольку признаков патологии у последних не выявлено.

4.2. Филогенетический анализ генотипа *Mycoplasma*

Филогенетический анализ последовательностей *Mycoplasma* из микробного сообщества кишечника рыб рода *Thymallus* показал, что они достоверно отличаются от таковых типовых штаммов и формируют отдельную ветвь в составе группы *hominis* с последовательностями микоплазм из кишечника других холодноводных рыб: *N. coriiceps* и *O. mykiss*. Ближайшие культивируемые родственники *Mycoplasma moatsii* и *M. sualvi* образуют с высокой апостериорной вероятностью отдельный кластер *M. sualvi* (рис. 2). Кроме того, последовательности района ITS байкальской *Mycoplasma* также значительно отличается от опубликованных последовательностей представителей класса Mollicutes.

Таблица 1

Результаты генотип-специфичной ПЦР и секвенирования лососевидных рыб из разных мест обитания

Место сбора проб	Виды рыб	Результаты генотип-специфичной ПЦР		Номера в базе данных
		Общее количество проанализированных рыб	Кол-во положительных ПЦР	
р. Ангара (г. Иркутск)	Черный байкальский хариус	5	5	FM897201, FM897202 FR799624–FR799626 FR799681, FR799683 FR799627–FR799634
Аквариум Байкальского музея, п. Листвянка	Черный байкальский хариус	1	1	FM897203 FR799635–FR799651
оз. Байкал	Черный байкальский хариус	5	5	FR799652, FR799653
	Байкальский омуль	3	2	FR799680
	<i>C. migratorius</i> × <i>C. lavaretus pidschian</i>	2	1	FR799684
оз. Тухурен-Нур, Восточные Саяны	Черный байкальский хариус	3	3	FR799670–FR799678 FR799682
р. Чечуй, бассейн реки Лена	Ленский хариус	10	10	FR799654–FR799669 FR799679
	Сиг	4	2	
	Валек	6	1	
	Ленок	7	3	
оз. Хубсугул, Монголия	Косогольский хариус	8	8	
	Налим	5	0	
оз. Арахлей, Забайкальский край	Окунь	10	0	

4.3. Культуральные и морфологические особенности генотипа *Mycoplasma*

Результаты использования тест-систем на *M. hominis* продемонстрировали специфическое изменение окраски селективной среды, указывающее на рост микоплазмы после 24 часовой инкубации в одном из трех образцов задних отделов кишечника черного байкальского хариуса из р. Ангара, при этом титр составлял 10^4 ЦОЕ/мл. Определение чувствительности к антибиотикам выявило резистентность микоплазмы ко всем представленным в тест-системе антибиотикам, кроме доксицилина.

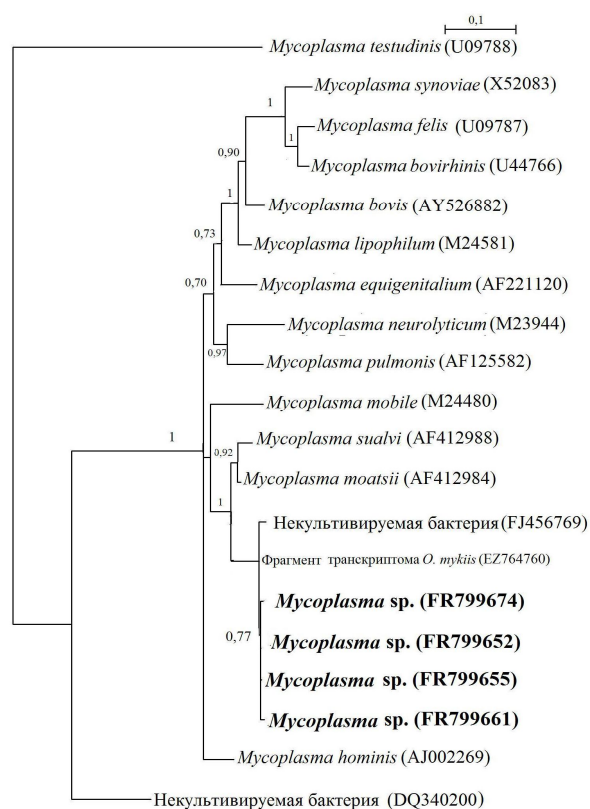


Рис. 2. Филогенетическое древо представителей группы *hominis* рода *Mycoplasma*, построенное байесовским методом с учетом вторичной структуры 16S рРНК. Показаны апостериорные вероятности. Последовательности, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом, в круглых скобках указан номер последовательности в банке данных.

Морфологию КМ в кишечном тракте рыб изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Отличительный признак КМ – трехслойная цитоплазматическая мембрана и их небольшие размеры (рис. 3). В поперечном сечении размер КМ составляет от 0,1 до 0,15 мкм, в продольном – до 1,5 мкм. На тонких срезах видна высокая численность, разные стадии роста КМ и их взаимодействие с клетками хозяина. КМ не имеют клеточной стенки, их формы варьируют от шаровидных до спиралевидных и изогнутых палочек (рис. 3).

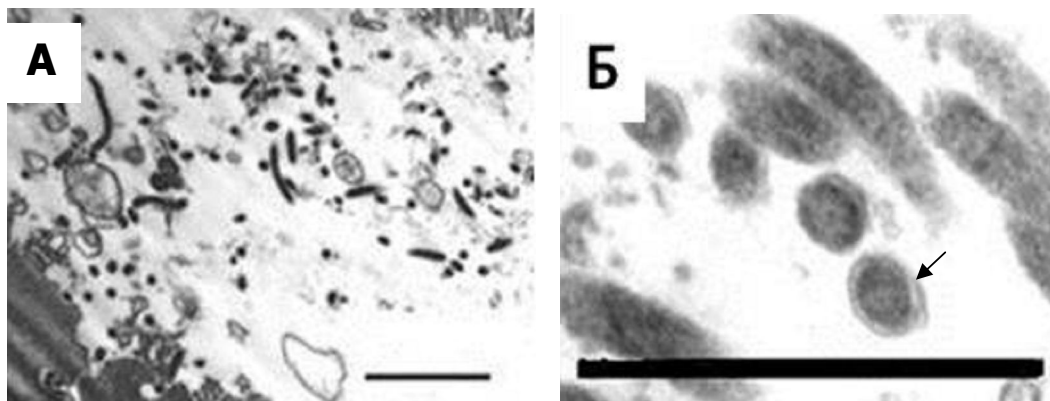


Рис. 3. Тонкие срезы заднего отдела кишечника с высоким титром КМ: А – полиморфизм КМ; Б – трехслойная цитоплазматическая мембрана КМ (указана стрелкой). Шкала: (А) 2 мкм; (Б) 1 мкм.

4.4. Количественная оценка распределения байкальского генотипа *Mycoplasma*

Серологический анализ (реакция агрегат-гемагглютинации – РАГА) показал присутствие в заднем и переднем отделах кишечника черного байкальского хариуса антигенов к *M. hominis*, титр которых варьировал от 1:2 до 1:4 Аг. Результаты РАГА в других органах (печень, почки, жабры) были отрицательными.

Селективная детекция с использованием антител на *M. hominis* выявила микоплазм во всех проанализированных органах и тканях рыб. При исследовании препаратов из кишечника свечение было максимальным, в других тканях и органах детектированы отдельные КМ в небольшом количестве, что, вероятно, свидетельствует о неспецифических взаимодействиях антител.

ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВА СООБЩЕСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЯЗВЕННЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ВНЕШНИХ ПОКРОВОВ РЫБ

Микрофлора язв внешних покровов рыб в условиях искусственного содержания меняется в зависимости от проводимых санитарно-профилактических мероприятий. В состав микробного сообщества язвенных проявлений у сигов до обработки аквариума входят представители класса Alphaproteobacteria и фил Actinobacteria, Firmicutes и Bacteroidetes (рис. 4А). После обработки аквариума химическими реагентами в язвах обнаружены как типичные представители сапрофитной микрофлоры (*Acinetobacter* sp., *Caulobacter* sp., *Comamonas* sp. и *Stenotrophomonas* sp.), так и известные ихтиопатогены класса Gammaproteobacteria (*Yersinia ruckeri* и *Aeromonas allosaccharophila*).

В язвах байкальского омуля детектированы представители филы Bacteroidetes, рода *Aeromonas* и паразитический гриб *Saprolegnia ferax*. Особенности экологии байкальского омуля в сочетании с физиологическим состоянием рыб после длительного подледного периода с низкой интенсивностью питания, высокой численностью гетеротрофов в устьевых и присклоновых зонах и оптимальной для развития патогенов температурой воды, вероятно, являются факторами, способствующими возникновению и передаче инфекций внутри нагульных стад.

В язвах окуня из оз. Арахлей определены: *Aeromonas salmonicida*, *A. veronii*, *Flavobacterium psychrophilum* и *Saprolegnia parasitica*. Кроме того, в групп-специфичной ПЦР детектированы представители филы Proteobacteria (классы beta-, alpha- и delta-), Planctomycetes, Bacteroidetes и Spirochaetes (рис. 4Б).

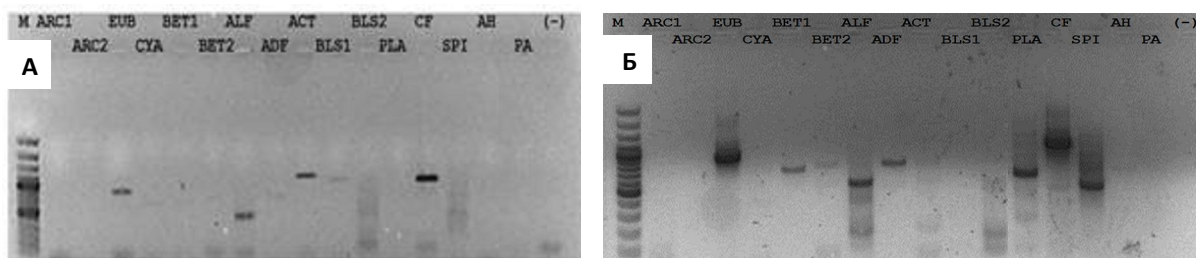


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации с суммарной ДНК, выделенной из язвы байкальского сига (А) и окуня (Б) на групп-специфичных праймерах: ARC1 и ARC2 – Archaea (600 и 625 п.н.); EUB – универсальные на ген 16S рРНК (900 п.н.); CYA – фила Cyanobacteria (600 п.н.); BET1 и BET2 – класс Betaproteobacteria (600 и 700 п.н.); ALF и ADF – классы Alpha- и Deltaproteobacteria (500 и 1000 п.н.); ACT – фила Actinobacteria (1100 п.н.); BLS1 и BLS2 – фила Firmicutes (1100 и 700 п.н.); PLA – фила Planctomycetes (600 п.н.); CF – фила Bacteroidetes (1050 п.н.); SPI – фила Spirochaetes (600 п.н.); AH – *Aeromonas hydrophila* (686 п.н.); PA – *Pseudomonas anguilliseptica* (439 п.н.). М – маркер молекулярного веса; (-) – отрицательный контроль.

ВЫВОДЫ

1. Для изучения сообществ микроорганизмов, ассоциированных с рыбами, разработан и применен комплекс молекулярно-генетических методов, включающий видо- и групп-специфичную ПЦР и клонирование целевых ампликонов, который позволяет детектировать широкий спектр микроорганизмов.
2. В составе кишечной микрофлоры байкальского омуля и рыб рода *Thymallus* определены представители аллохтонной и автохтонной микрофлоры. К аллохтонной отнесены строгие аэробы, представители филы Proteobacteria: *Azospirillum*, *Bradyrhizobium*, *Comamonas*, *Collimonas*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas*, *Quatrionicoccus*, *Stenotrophomonas*, некультивируемые бактерии фил Bacteroidetes и Actinobacteria, широко распространенные в водных экосистемах.
3. Состав собственной микрофлоры байкальского омуля и рыб рода *Thymallus* включает представителей родов *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Brevinema*, *Caulobacter*, *Clostridium*, *Deefgea*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycoplasma*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Spironema*, *Sphingomonas* и некультивируемые Deltaproteobacteria, среди которых преимущественно описаны факультативные и облигатные анаэробы, являющиеся типичными представителями кишечной микрофлоры гомойотермных и пойкилотермных животных.
4. Исследование кишечной микрофлоры байкальского омуля разных МЭГ показало, что при смене спектра питания увеличивается разнообразие доминирующих микроорганизмов, а стабильность питания ведет к формированию устойчивого микробного сообщества с небольшим числом таксономических единиц.
5. Специфичными представителями микрофлоры черного байкальского хариуса из разных мест обитания определены представители филы Spirochaetes и *Mycoplasma* sp.

6. *Mycoplasma* sp. является специфичным для лососевидных рыб представителем кишечной микрофлоры. Определена зараженность рыб: род *Thymallus* – 100%; *Coregonus migratorius* – 60%; *Coregonus lavaretus pidschian* – 50%; *Prosopium cylindraceum* – 15%; *Brachymystax lenok* – 40%. Филогенетический анализ выявил принадлежность байкальской *Mycoplasma* sp. к группе *hominis*, что подтверждено культуральными и серологическими методами.
7. Язвенные заболевания внешних покровов рыб имеют комплексную этиологию. Кроме типичных представителей ихтиопатогенов родов *Flavobacterium*, *Aeromonas* и *Yersinia*, детектированы паразитические грибы *Saprolegnia parasitica* и *S. ferax*.
8. В качестве ключевых видов индикаторных микроорганизмов для мониторинга состояния среды обитания и оценки эпизоотологической ситуации в водоемах и водотоках Восточной Сибири определены *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas allosaccharophila*, *A. salmonicida*, *A. veronii* и *Yersinia ruckeri*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. Адаптация методов молекулярно-генетического анализа для изучения микроорганизмов, ассоциированных с рыбами / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова** [и др.] // Биология внутренних вод. – 2008. – № 2. – С. 91–94.
2. Белькова Н. Л. Молекулярно-генетическая детекция непатогенного генотипа *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) в черном байкальском хариусе (*Thymallus arcticus baicalensis* Dybowski, 1874) / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова** // Изв. РАН. Сер. биол. – 2008. – Т. 35. – № 2. – С. 253–256.
3. Молекулярно генетическая и культуральная диагностика *Mycoplasma* в рыбах сем. Thymallidae / **Е. В. Суханова** [и др.] // Доклады Академии Наук. – 2011. – Т. 440. – № 1. – С. 139–141.
4. Молекулярно-генетический мониторинг ассоциированной микрофлоры лососевидных рыб: разнообразие и физиологический статус / Н. Л. Белькова, **Е. В. Суханова** [и др.] // Изв. Самарского науч. центра РАН. – 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 1108–1114.
5. Определение индикаторных микроорганизмов для мониторинга инфекционных заболеваний рыб на примере *Perca fluviatilis* (озеро Арахлей, Забайкальский край) / **Е. В. Суханова** [и др.] // Изв. Самарского науч. центра РАН. – 2010. – Т. 12. – № 1. – С. 1156–1161.
6. Современные подходы и методология экологического мониторинга в условиях водоема и в аквакультуре / Е. В. Дзюба, Н. Л. Белькова, Н. Н. Деникина, **Е. В. Суханова** [и др.] // Изв. Самарского науч. центра РАН. – 2009. – Т. 11. – № 1. – С. 466–471.
7. Поиск факторов, определяющих разнообразие генотипов кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса / **Е. В. Суханова** [и др.] // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер. Биология. Экология. – 2009. – Т. 2. – № 1. – С. 127–132.

Глава в монографии:

8. Белькова Н. Л. Молекулярно-генетическая идентификация кишечной микрофлоры и протистов байкальских рыб / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова** // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. – Новосибирск : Изд-во Наука, 2009. – Т. 2. – С. 957–980.

Учебно-методическое пособие:

9. Определение условий пробоотбора для получения корректных молекулярно-генетических данных / О. П. Дагурова, **Е. В. Суханова** [и др.] // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России. – Борок : Изд-во Принтхаус, 2009. – С. 75–89.

Материалы конференций:

10. Белькова Н. Л. Детекция представителей Diplomonadida (Hexamitidae) в лососевидных рыбах озера Байкал молекулярно-генетическим методом / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова** // Биоразнообразие и роль животных в экосистемах : материалы четвертой межд. науч. конф. Днепропетровск, 9–12 октября 2007 г. – Днепропетровск, 2007. – С. 322–324.
11. Белькова Н. Л. Детекция *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) в черном байкальском хариусе методом ПЦР / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова** // Микроорганизмы и биосфера : материалы межд. науч. конф. Москва, 19–20 ноября 2007 г. – Москва : МАКС Пресс, 2007. – С. 9–10.
12. Белькова Н. Л. Молекулярно-генетическая детекция патогенной микрофлоры рыб: проблемы и решения / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова** // Состояние и проблемы искусственного воспроизводства рыбных запасов Байкальского региона : материалы регион. науч.-прак. конф. Улан-Удэ, 10–12 июля 2008 г. – Улан-Удэ : Изд-во ЭКОС, 2008. – С. 26–28.
13. Детекция генотипа *Mycoplasma* в кишечной микрофлоре рыб сем. Thymallidae, обитающих в водоемах Восточной Сибири / **Е. В. Суханова** [и др.] // Современные проблемы микробиологии центральной Азии : материалы всерос. конф. с межд. уч. Улан-Удэ, 27–28 мая 2010 г. – Улан-Удэ : Бурят. ун-та, 2010. – С. 45–49.
14. Дзюба Е. В. Генетическое разнообразие кишечной микрофлоры черного байкальского хариуса (*Thymallus arcticus baicalensis* Dybowski, 1874) / Е. В. Дзюба, **Е. В. Суханова**, Н. Л. Белькова // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии : материалы межд. науч. конф. Минск, 2–6 июня 2008 г. – Минск : Изд-во И.П. Логвинов, 2008. – С. 85–87.
15. Идентификация микроорганизмов, вызывающих бактериальные инфекции внешних покровов рыб в аквариумных экспозициях / **Е. В. Суханова** [и др.] // Актуальные вопросы деятельности академических естественно-научных музеев : материалы межд. науч. конф. п. Листвянка, 3–7 февраля 2010 г. – Новосибирск : Изд-во Академическое изд-во ГЕО, 2010. – С. 165–169.
16. Изучение микрофлоры черного байкальского хариуса: использование разных методов выделения ДНК для молекулярно-генетического анализа / Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба, Т. А. Ханаева, **Е. В. Суханова** // Экология в современном мире: взгляд научной молодежи : материалы всерос. конф. мол. уч. Улан-Удэ, 24–27 апреля 2007 г. – Улан-Удэ : Изд-во ГУЗ РЦМП МЗ РБ, 2007. – С. 5–6.
17. Изучение микрофлоры, ассоциированной с лососевидными рыбами из водоемов Восточной Сибири / **Е. В. Суханова** [и др.] // Симбиоз-Россия 2011 : материалы IV всерос. с межд. уч. конгр. студ. и асп.-биологов Воронеж, 23–27 мая 2011 г. – Воронеж : Изд-во Воронеж. ун-та, 2011. – Т. 2. – С. 208–210.
18. Исследование зараженности рыб зооспоровыми грибами сем. Saprolegniaceae (Oomycetes) / Н. Н. Деникина, Н. Л. Белькова, **Е. В. Суханова** [и др.] // Высокие технологии в экономике Иркутской области (промышленность, медицина, сельское хозяйство) : материалы науч.-прак. конф. Иркутск, 6 февраля 2009 г. – Иркутск : Ирк. гос. тех. ун-та, 2009. – С. 37–39.
19. Молекулярно-генетические методы в изучении симбионтной и паразитической микрофлоры байкальских рыб / **Е. В. Суханова** [и др.] // Материалы 2-го Байкальского микробиологического симпозиума Иркутск, 10–15 сентября 2007 г. – Иркутск : Изд-во Инст. географии им. Сочавы, 2007. – С. 221–222.
20. Молекулярно-генетические методы в экологическом мониторинге пресноводных экосистем / Е. В. Дзюба, Н. Л. Белькова, **Е. В. Суханова** [и др.] // Высокие технологии в экономике Иркутской области (промышленность, медицина, сельское хозяйство) :

- материалы науч.-прак. конф. Иркутск, 6 февраля 2009 г. – Иркутск : Ирк. гос. тех. ун-та, 2009. – С. 35–37.
21. Небесных И. А. Новые возможности экологического мониторинга рыб озера Байкал / И. А. Небесных, **Е. В. Суханова** // Проблемы естественнонаучного образования : материалы конф. по итогам науч.-иссл. работ студ. Иркутск, 23 апреля 2009 г. – Иркутск : Изд-во Вост.-Сиб. гос. академия обр., 2009. – С. 38–46.
 22. Опыт культивирования *Mycoplasma* из кишечника черного байкальского хариуса / **Е. В. Суханова** [и др.] // Пятая международная Верещагинская байкальская конференция : материалы всерос. конф. с межд. уч. Иркутск, 4–9 октября 2010 г. – Иркутск : Изд-во ОАО Ирк. обл. тип. №1, 2010. – С. 157–158.
 23. Становление ассоциированной микрофлоры в онтогенезе байкальского омуля / **Е. В. Суханова** [и др.] // Пятая международная Верещагинская байкальская конференция : материалы всерос. конф. с межд. уч. Иркутск, 4–9 октября 2010 г. – Иркутск : Изд-во ОАО Ирк. обл. тип. №1, 2010. – С. 156.
 24. **Суханова Е. В.** Генетическое разнообразие и распространение спирохет в кишечной микрофлоре лососевидных рыб в водоемах Восточной Сибири / **Е. В. Суханова**, Е. В. Дзюба, Н. Л. Белькова // Симбиоз-Россия 2010 : материалы III всерос. конгр. студ. и асп.-биологов Нижний Новгород, 24–29 мая 2010 г. – Нижний Новгород : Изд-во Ниж. ун-та, 2010. – С. 76–77.
 25. **Суханова Е. В.** Детекция нового генотипа *Mycoplasma* в кишечнике черного байкальского хариуса (*Thymallus arcticus baikalensis* Dybowski, 1874) из озера Байкал и реки Ангара / **Е. В. Суханова**, Н. Л. Белькова // Материалы X Съезд гидробиологического общества при РАН Владивосток, 28 сент.–2 окт. 2009 г. – Владивосток : Изд-во «Дальнаука» ДВО РАН, 2009. – С. 388.
 26. **Суханова Е. В.** Детекция представителей Diplomonadida (Hexamitidae) в лососевидных рыбах байкальского региона молекулярно-генетическим методом / **Е. В. Суханова**, И. А. Небесных // Перспективы развития инноваций в биологии : материалы II науч.-прак. конф. Москва, 5–7 ноября 2008 г. – Москва : Изд-во МАКС Пресс, 2008. – С. 101–103.
 27. **Суханова Е. В.** Изучение кишечной микрофлоры рыб молекулярно-генетическими методами / **Е. В. Суханова**, Е. В. Дзюба, Н. Л. Белькова // Симбиоз-Россия 2009 : материалы II всерос. конгр. студ. и асп.-биологов Пермь, 25–29 мая 2009 г. – Пермь : Изд-во ОТ и ДО, 2009. – С. 77–78.
 28. **Суханова Е. В.** Перспективы использования современных молекулярно-генетических методов для изучения биоразнообразия / **Е. В. Суханова**, Н. Л. Белькова, Е. В. Дзюба // Молодёжь и наука Забайкалья : материалы молод. науч. конф. Чита, 9–11 декабря 2008 г. – Чита : Заб. гум.-пед. ун-т им. Чернышевского, 2008. – С. 47–49.
 29. Тест-системы для диагностики бактериальных инфекций рыб / Н. Л. Белькова, **Суханова Е. В.** [и др.] // Высокие технологии в экономике Иркутской области (промышленность, медицина, сельское хозяйство) : материалы науч.-прак. конф. Иркутск, 6 февраля 2009 г. – Иркутск : Ирк. гос. тех. ун-та, 2009. – С. 33–35.
 30. **Sukhanova Ye. V.** Phylogenetic analysis of the intestinal microflora of *Thymallus baicalensis* Dybowski, 1874 / **Ye. V. Sukhanova**, Ye. V. Dzyuba, N. L. Bel'kova // SIAL 5 : abstracts of the 5 th International Symposium Speciation in Ancient Lakes Ohrid, 7–11 september 2009. – Ohrid : JHY Хидробиолошки ЗАВОД-ОХРИД, 2009. – P. 125–126.
 31. **Sukhanova Ye. V.** Studies of intestinal microflora in fishes by molecular genetics methods / **Ye. V. Sukhanova**, Ye. V. Dzyuba, N. L. Bel'kova // Biology: Expansion of Borders : abstracts of the 13th annual symposium for Biology Students of Europe Kazan, 30 july – 7 august 2009. – Kazan : Kaz. st. univ-ty., 2009. – P. 68–69.