

На правах рукописи



БАШЕНХАЕВА
Мария Викторовна

ПОДЛЕДНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОЗЕРА БАЙКАЛ

03.02.08 – Экология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Иркутск – 2018

Работа выполнена в отделе ультраструктуры клетки в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

Научный руководитель: **Захарова Юлия Робертовна**
кандидат биологических наук, с.н.с. отдела ультраструктуры клетки ФГБУН Лимнологический институт СО РАН

Официальные оппоненты: **Дедыш Светлана Николаевна**
доктор биологических наук, заведующая лабораторией микробиологии болотных экосистем Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», г. Москва

Зайцева Светлана Викторовна
кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук», г. Улан-Удэ

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Хабаровск

Защита диссертации состоится «28» февраля 2019 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, Байкальский музей им. профессора М. М. Кожова (ауд. 219).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет» им. В. Г. Распутина по адресу: 664074, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 124 и на сайте Иркутского государственного университета: <https://isu.ru/ru/science/boards/dissert/dissert.html?id=149>

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

Автореферат разослан «10» января 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент



А. А. Приставка

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Подо льдом в водных экосистемах на границе раздела фаз «лед – вода» формируется сложная динамичная среда, условия которой отличаются от условий в водной толще за счет наиболее интенсивного поступления солнечной радиации (Gosselin et al., 1990), повышенной концентрации питательных веществ (Cota et al., 1987) и стабильно низкой температуры (Mock et al., 1997). Подледные микробные сообщества, основными компонентами которых являются микроводоросли и бактерии, развиваются непосредственно на нижней поверхности льда и в слое воды, прилегающей ко льду. Микроводоросли подледных сообществ составляют основу первичной продукции водоема в последующие сезоны (Hampton et al., 2017). Гетеротрофные бактерии участвуют в круговороте веществ и энергии водоема, минерализуя органические вещества (Bölter, Dawson, 1982; Delille et al., 1988, 1995; Delille, Rosiers, 1996; Biddanda, Cotner, 2002; Karlsson et al., 2009). Исследования подледных микробных сообществ в морских экосистемах проводятся на протяжении последних десятков лет, в особенности в районах Арктики и Антарктики (Gutt, 1995; Gradinger, 1996; Ambrose et al., 2005; Voetius et al., 2013; Poulin et al., 2014). В пресных водоемах в ледовый период в основном исследуют фито- и бактериопланктон водной толщи (Watson et al., 2001; Bertilsson et al., 2013; Ривьер, 2016). Развитие микроводорослей на разделе фаз «лед – вода» в пресноводных водоемах показано для реки Амур (Юрьев, Лебедев, 1988) и для озера Ханка (Усольцева и др., 2006).

Озеро Байкал – самое крупное пресноводное озеро в мире имеет длительный период ледостава. В феврале – марте в Байкале массово развиваются диатомовые водоросли и динофлагелляты на границе раздела фаз «лед – вода» (Оболкина и др., 2000; Bondarenko et al., 2006; Annenkova et al., 2015). Исследования таксономического состава и численности бактерий подо льдом в водной толще проводили с помощью микроскопии (Straškrábová et al., 2005) и флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) (Ahn et al., 1999). Бактериальные сообщества, развивающиеся на границе раздела фаз «лед – вода», до настоящего времени изучены не были. Исследование структуры подледных микробных сообществ в разных экологических зонах и во временной динамике ведет к пониманию процессов развития микробных сообществ в водной экосистеме озера Байкал.

Цель работы: Изучить биоразнообразие, структуру и динамику развития подледных микробных сообществ в разных экологических зонах озера Байкал.

Задачи исследования:

1. Определить количественные характеристики и видовой состав микроводорослей подледных микробных сообществ озера Байкал с помощью световой и электронной микроскопии, изучить внутрисезонную и межгодовую динамику сообществ литоральной, склоновой и пелагической зон.

2. Определить общую численность бактерий, численность культивируемых гетеротрофных бактерий и их таксономический состав в подледных микробных сообществах озера Байкал.

3. Исследовать таксономическую структуру и биоразнообразие подледных бактериальных сообществ, развивающихся на границе «лед – вода», с помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК.

4. Провести сравнительный анализ бактериальных сообществ границы раздела фаз «лед – вода», подледной воды и фотического слоя в период открытой воды, и выявить взаимосвязь структуры и разнообразия сообществ от условий среды обитания.

Научная новизна работы. Впервые проведено исследование подледных микробных сообществ в разных экологических зонах озера Байкал во временной динамике с использованием комплекса методов световой и сканирующей электронной микроскопии, микробиологии и высокопроизводительного секвенирования. Впервые показано развитие на разделе фаз «лед – вода» сообществ с доминированием диатомей *Fragilaria radians* (Kützing) D.M. Williams & Round (= *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabitshevsky) и *Ulnaria danica* Compère & Bukhtiyarova (= *Synedra ulna* var. *danica* (Kützing) Grunow), а также сообществ с доминированием зеленых водорослей *Chlorella* sp. С помощью высокопроизводительного секвенирования фрагментов гена 16S рРНК установлено, что структура бактериальных сообществ границы раздела фаз «лед – вода» отличается от сообществ подледной воды и фотического слоя в период открытой воды. Полученные последовательности фрагментов гена 16S рРНК из подледных сообществ озера Байкал имеют сходство 99–100 % с последовательностями некультивируемых бактерий подледных экосистем Арктики и Антарктики. Впервые определена таксономическая принадлежность и ферментативная активность культивируемых психротолерантных бактерий из

подледных микробных сообществ озера Байкал. Впервые из озера Байкал изолированы бактерии рода *Knoellia*, которые ранее не были обнаружены в водных экосистемах.

Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.

Полученные данные расширяют представление о разнообразии подледных микробных сообществ озера Байкал. Культивируемые психротолерантные бактерии могут быть использованы для изучения механизмов адаптации к низким температурам. Массивы данных пиросеквенирования, полученные в ходе работы (свыше 116 тыс. нуклеотидных последовательностей), зарегистрированы в базе данных NCBI и могут быть использованы для сравнительного анализа с последовательностями из других холодноводных сред обитания.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Подледные микробные сообщества, которые развиваются на границе раздела фаз «лед – вода» озера Байкал, обладают высоким разнообразием и формируют несколько типов с доминированием различных видов микроводорослей. Микробные сообщества характеризуются динамичной структурой, изменяются в течение одного ледового сезона, по годам и экологическим зонам.

2. Биоразнообразие, структура и состав доминирующих флотипов подледных микробных сообществ отличаются от сообществ подледной воды и фотического слоя в период открытой воды, что определяется физико-химическими особенностями среды на границе раздела фаз «лед – вода».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на: V-ой Верещагинской Байкальской конференции (Иркутск, 2010); Байкальском Микробиологическом симпозиуме с международным участием (Иркутск, 2011, 2015); XX-ой Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2013» (Москва, 2013); VI-ом Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); IV-ой Международной конференции “MiCom” (Йена, Германия, 2014); X-ом Международном конгрессе “Extremophiles 2014” (Санкт-Петербург, 2014); IX-ом Симпозиуме европейских пресноводных наук (SEFS 9) (Женева, Швейцария, 2015); XXV-ой конференции Goldschmidt (Прага, Чехия, 2015); X-ом международном молодежном форуме «Байкал» (Ольхонский район, 2017); II-ой Всероссийской конференции с международным

участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике» (Новосибирск, 2017); I-ом Российском микробиологическом конгрессе (Пушино, Россия, 2017).

Личный вклад автора. Автор принимал участие в экспедиционных работах, результаты которых вошли в диссертацию. Все результаты за исключением химического анализа воды и проведения секвенирования получены лично автором, либо при его непосредственном участии в ходе коллективных работ. По результатам проведенных работ в соавторстве подготовлены статьи в рецензируемых изданиях. Автор анализировал литературу по теме работы и принимал участие в статистической и биоинформационной обработке данных и обсуждении результатов, полученных в ходе полевых и лабораторных работ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, из них 3 статьи в журналах из перечня ВАК, 2 статьи, индексируемых Web of Science, 1 статья в журнале, индексируемом РИНЦ и 11 тезисов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, заключения, списка литературы и 8 приложений. Работа изложена на 197 страницах, содержит 43 рисунка и 13 таблиц. Список литературы включает 391 источник, из которых 90 отечественных и 301 зарубежный.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Ю.Р. Захаровой и д.б.н., проф. Е.В. Лихошвай за постановку задач и всестороннюю помощь в работе. И.В. Ханаеву, к.б.н. А.Б. Купчинскому, А.Е. Бормотову, Ю.А. Ющуку, Н.А. Волокитиной, к.б.н. С.М. Шишлянникову и к.б.н. И.С. Михайлову за помощь в отборе проб; к.б.н. Д.П. Петровой – в освоении молекулярно-биологических методов, к.б.н. Ю.П. Галачьянцу – за помощь в анализе данных пиросеквенирования, к.б.н. Г.В. Помазкиной, к.б.н. М.В. Усольцевой и Л.А. Титовой – за помощь в анализе проб фитопланктона; к.г.н. В.М. Домышевой и к.г.н. М.В. Сакирко – за предоставление материалов по гидрохимии и всем коллегам отдела Ультраструктуры клетки ЛИН СО РАН за практическую помощь и ценные советы на всех этапах работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

С использованием зарубежной и отечественной литературы описаны биоразнообразие и структура подледных микробных сообществ и особенности экологических условий их обитания. Представлены результаты изучения подледных микробных сообществ в озере Байкал.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалами для исследования были пробы подледных микробных сообществ, отобранные в южной котловине озера Байкал (полуразрез Варначка–Танхой в районе пос. Большие Коты) в литоральной, склоновой и пелагической зонах (рис. 1). Исследования были проведены с 2010 по 2015 гг. в период

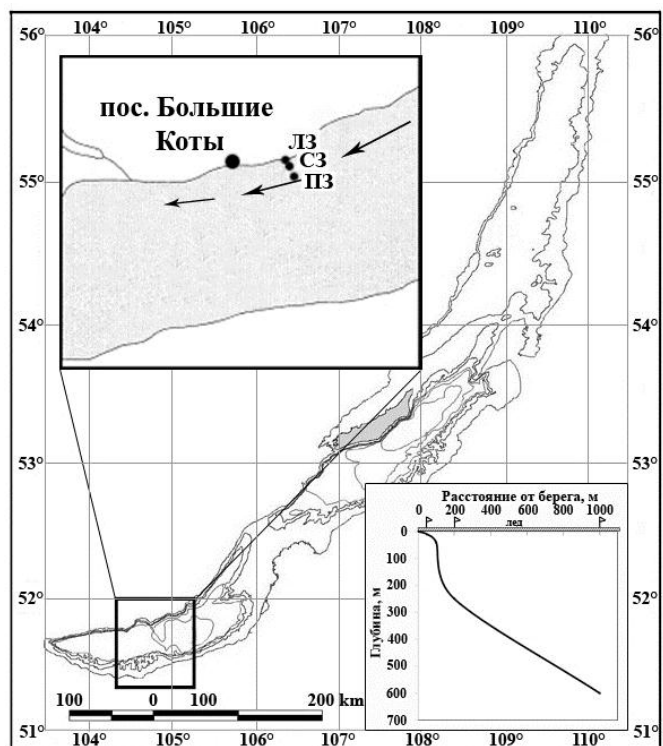


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб и профиль глубины. ЛЗ – литоральная зона, СЗ – склоновая зона и ПЗ – пелагическая зона. Стрелками указано направление подледных течений.

ледостава с февраля по апрель и в период после вскрытия озера ото льда в мае 2013, 2015 гг. Пробы воды пограничного слоя раздела фаз «лед – вода» отбирали сотрудники группы водолазных исследований ЛИН СО РАН с поверхности льда вокруг майны при помощи шприцов. Пробы подледной воды с глубины 10 м отбирали при помощи батометра Нискина. В период после вскрытия озера ото льда пробы были отобраны с борта НИС «Академик В. А. Коптюг» с помощью системы батометров карусель SBE 32. Пробы отбирали из фотического слоя воды с глубин 0, 5, 10, 15, 20, 25 м, затем объединяли в один образец.

Для определения видового разнообразия, численности и биомассы микроводорослей пробы фиксировали раствором Люголя (Utermöl, 1958). Подсчет микроводорослей проводили на световом микроскопе Axiostar Plus (“Zeiss”, Германия). Численность рассчитывали по методике Г.В. Кузьмина (Кузьмин, 1975), биомассу – по методу «истинного объема» клеток (Макарова, Пичкилы, 1970; Белых и др., 2011). Для определения видового состава диатомовых водорослей пробы обрабатывали 30 % раствором перекиси водорода. Препараты анализировали на сканирующем электронном микроскопе FEI Company Quanta 200 (“FEI Company”, США). Для определения общей численности бактерий (ОЧБ) пробы фиксировали раствором глутарового альдегида (конечная концентрация 2,5 %) и окрашивали

флуорохромным красителем ДАФИ (4,6-диамино-2-фенилиндол) (“Sigma-Aldrich”, США) (Porter, Feig, 1980; Nagata, 1994).

Для культивирования гетеротрофных бактерий использовали рыбо-пептонный агар, разбавленный в 10 раз (РПА:10) (Горбенко, Дзюбан, 1992), и диатомовый агар (ДА), где в качестве источника органического вещества был гидролизат диатомовых водорослей (Захарова и др., 2010). Чистые культуры получали в серии пересевов методом истощающего штриха до отдельных колоний. Определение морфологических признаков клеток бактерий проводили с помощью световой и эпифлуоресцентной микроскопии. Определяли протеолитическую, амилолитическую, каталазную и фосфолипазную активности бактериальных штаммов (Практикум..., 2005).

Для выделения ДНК из природных проб и чистых культур использовали модифицированный метод фенол-хлороформной экстракции (Marmur, 1961; Zakharova et al., 2013a). Амплификацию гена 16S рРНК чистых культур проводили с универсальными праймерами EUB 27F и 1350R в амплификаторе “БИС” М-111 (БИС-Н, Новосибирск). Очистку ДНК и секвенирование по Сенгеру проводили с праймерами 27F и 500L в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск). Полученные нуклеотидные последовательности были объединены в контиги со средней длиной 1300 п.н. Филогенетический анализ проводили путем поиска гомологичных последовательностей в базе данных GenBank с помощью программы BLASTN (Altschul et al., 1997). Филогенетическое дерево построено с использованием метода объединения ближайших соседей на основе «двухпараметрической дистанции Кимуры» в программе MEGA версия 6. Для определения структуры сообществ проводили амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, содержащего один варибельный район V3, с использованием праймеров U341F и U515R для образцов ДНК, выделенных из проб 2011 г. Для образцов, выделенных из проб 2013 и 2015 гг., проводили амплификацию фрагмента гена 16S рРНК, содержащего два варибельных района V3 и V4, с использованием праймеров U341F и U785R. Пиросеквенирование полученных фрагментов проводили на платформе GS FLX 454 (“Roche”, США), данные анализировали с помощью программного обеспечения Mothur v1.35.1 (Schloss et al., 2009).

Температуру на границе раздела фаз «лед – вода» измеряли при помощи портативного термодатчика, температуру подледной воды – с использованием электронного термометра с выносным датчиком. Толщину льда и толщину

снежного покрова измеряли при помощи рулетки. Заснеженность поверхности льда в районах проведения исследований определяли визуально отношением площади покрытых снегом участков льда к площади ледяного покрова. Определение химических компонентов (фосфата, азота, кремния и органического вещества) в пробах воды проводили сотрудники лаборатории Гидрохимии и химии атмосферы ЛИН СО РАН к.г.н. В. М. Домышева, к.г.н. М. В. Сакирко и гл. спец. Н. В. Башенхаева.

ГЛАВА 3. ЭКОЛОГИЯ РАЗВИТИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ПОДЛЕДНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ЮЖНОГО БАЙКАЛА

В период исследования в 2010–2015 гг. в Южном Байкале (полуразрез Варначка – Танхой) на границе раздела фаз «лед – вода» развивались сообщества с доминированием разных видов микроводорослей: диатомей *Aulacoseira baicalensis* (K. Meyer) Simonsen и *A. islandica* (Otto Müller) Simonsen (= *Aulacoseira skvortzowii* M. B. Edlund, Stoermer & C. M. Taylor); динофлагеллят *Gymnodinium baicalense* N. L. Antipova; *Peridinium euryceps* Rengefors & B. Meyer; диатомей *Fragilaria radians* (Kützing) D.M. Williams & Round (= *Synedra acus* subsp. *radians* (Kützing) Skabitshevsky) и *Ulnaria danica* Compère & Bukhtiyarova (= *Synedra ulna* var. *danica* (Kützing) Grunow); и зеленой микроводоросли *Chlorella* sp. (рис. 2). Структура подледных микробных сообществ отличалась от сообществ подледной воды и открытой воды (рис. 3). В сообществах подледной воды развивалось несколько видов микроводорослей по численности и биомассе представленных равномерно, в то время как в подледном сообществе чаще присутствовал либо абсолютный доминант, либо два-три доминирующих вида. Значения численности и биомассы непосредственно подо льдом был на несколько порядков выше, чем в подледной воде. Развитие микроводорослей в подледных микробных сообществах происходило неравномерно в зависимости от зоны развития и периода вегетации. Выявлены межгодовые и пространственные изменения численности и биомассы микроводорослей, а также изменения в течение одного подледного периода. Согласно количественным показателям 2011 и 2012 гг. были менее урожайные по сравнению с 2010, 2013 и 2015 гг. В 2013 г. массово развивались динофлагелляты *G. baicalense*, максимальные значения их численности и биомассы были в склоновой зоне – 8,9 млн кл./л.

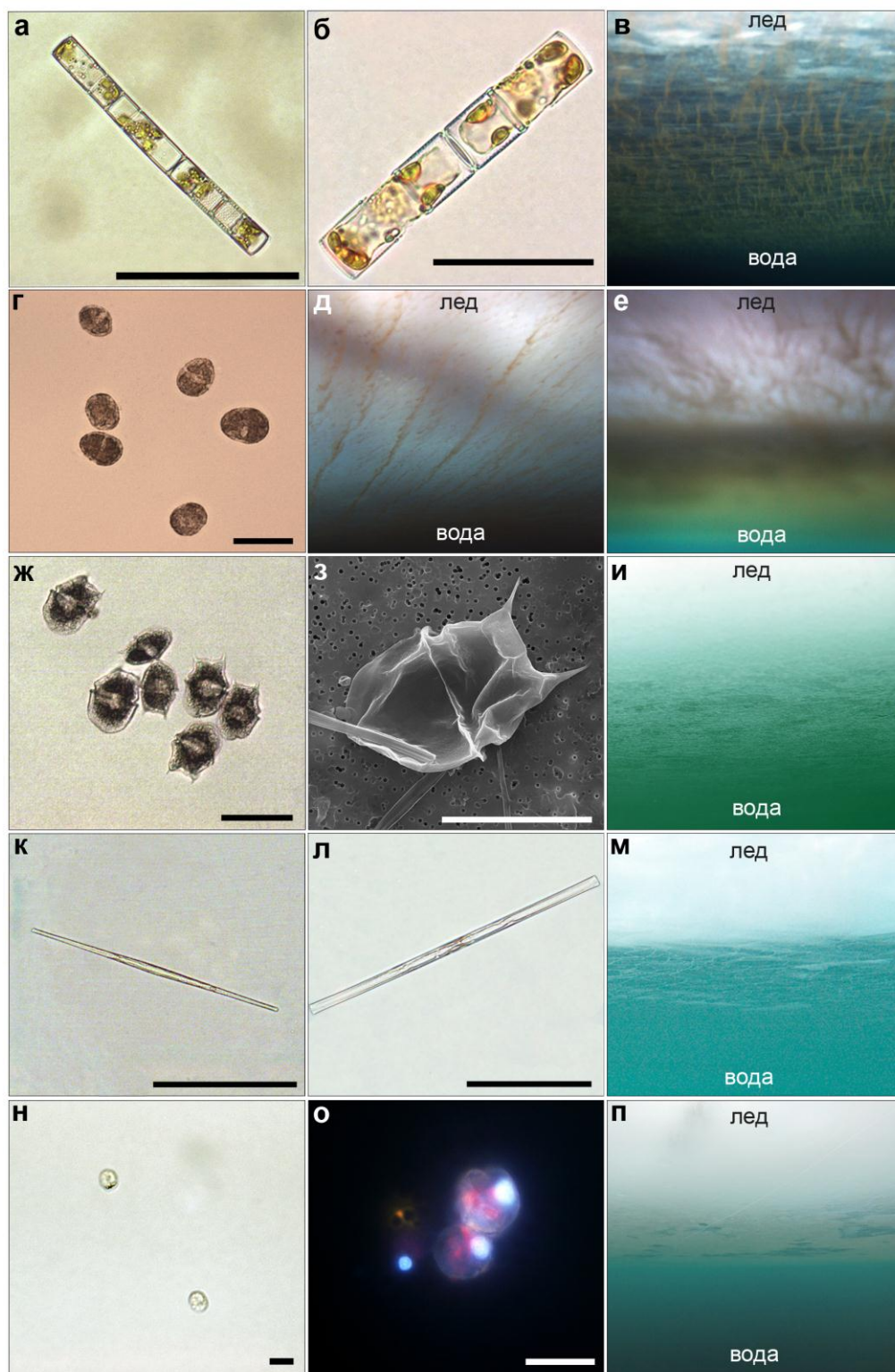


Рис. 2. Микроводоросли из подледных микробных сообществ озера Байкал: диатомеи *A. baicalensis* (а); *A. islandica* (б); динофлагелляты *G. baicalense*, (г); *P. euryceps* (ж, з); диатомеи *F. radians* (к) и *U. danica* (л); зеленая микроводоросль *Chlorella* sp. (н, о); подледная фотосъемка сообществ (фото И.В. Ханаева) с доминированием *A. islandica* и *A. baicalensis* (в); *G. baicalense* в начале марта (д), в начале апреля (е); *P. euryceps* (и); *F. radians* и *U. danica* (м); *Chlorella* sp. (п); световая микроскопия (а, б, г, ж, к, л, н); СЭМ (з); эпифлуоресцентная микроскопия (о). Масштаб: а, к, л – 100 мкм; б, г, ж – 50 мкм, з – 30 мкм, н, о – 10 мкм.

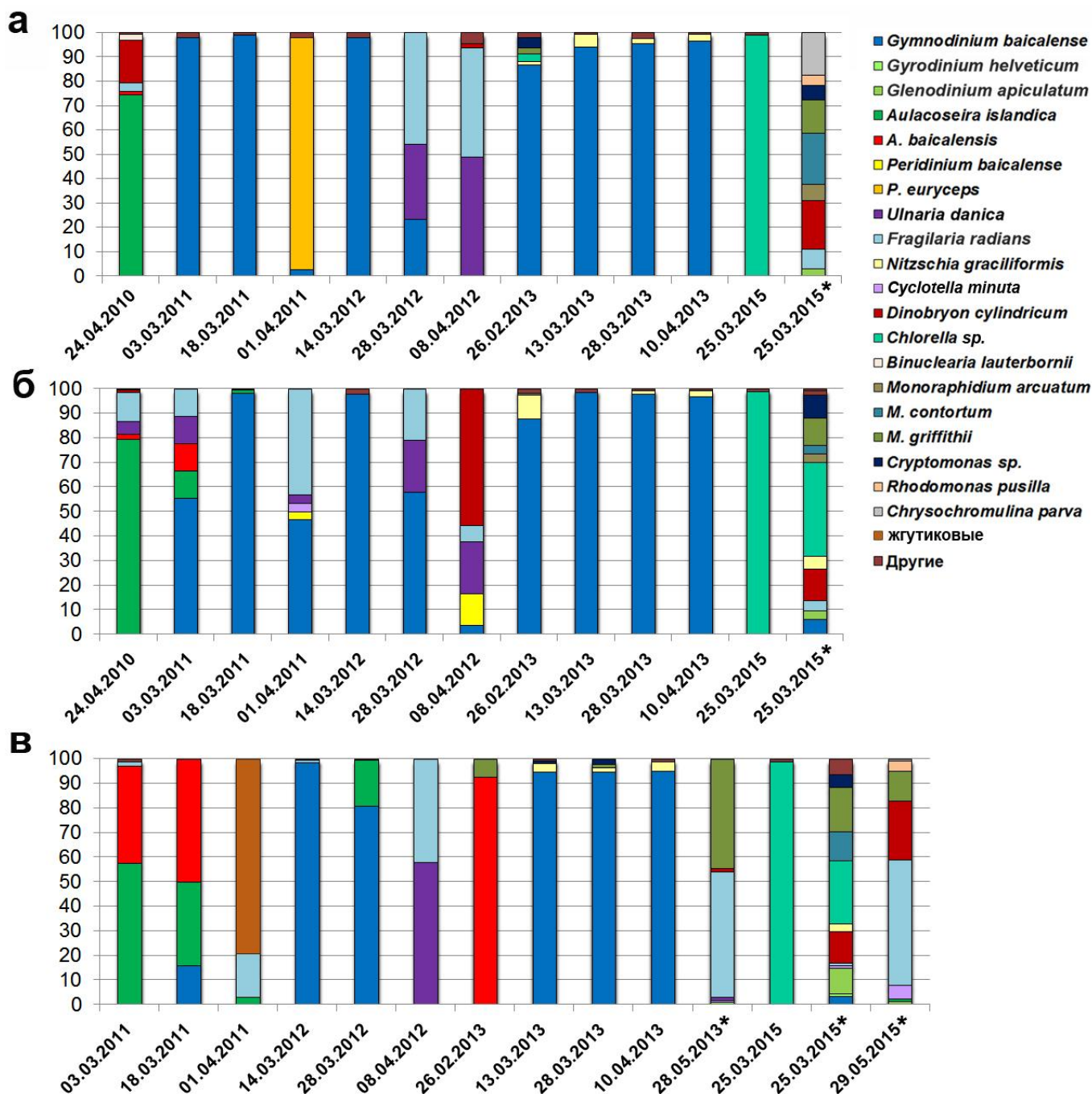


Рис. 3. Процентное соотношение численности микроводорослей в подледных микробных сообществах литоральной (а), склоновой (б) и пелагической (в) зон. Примечание - * отмечены сообщества подледной воды с глубины 10 м и фотического слоя в весенний период.

ГЛАВА 4. ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ БАКТЕРИЙ В ПОДЛЕДНЫХ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ ЮЖНОГО БАЙКАЛА

В подледных микробных сообществах общая численность бактерий (ОЧБ) и численность культивируемых гетеротрофов (ЧКГБ) на несколько порядков выше, чем таковые в сообществах подледной воды и фотического слоя в весенний

период. Максимум ОЧБ – 71×10^6 кл./мл выявлен в подледных микробных сообществах литоральной зоны в конце апреля (рис. 4) с доминированием диатомей *A. islandica*.



Рис. 4. Общая численность бактерий ($\times 10^6$ кл./мл) в подледных микробных сообществах литоральной (а), склоновой (б) и пелагической (в) зон. Примечание - * отмечены сообщества подледной воды с глубины 10 м и фотического слоя в весенний период.

Также в сообществах литоральной зоны отмечен максимум ЧКГБ на среде ДА при 4 °С (20424 КОЕ/мл); на среде РПА:10 максимум отмечен в сообществе склоновой зоны (60160 КОЕ/мл). Выявлено, что ОЧБ и ЧКГБ увеличивались к концу марта – началу апреля, при увеличении биомассы микроводорослей. Кроме того, увеличивалось количество бактерий, ассоциированных с клетками диатомовых водорослей (рис. 5) по сравнению с началом марта.

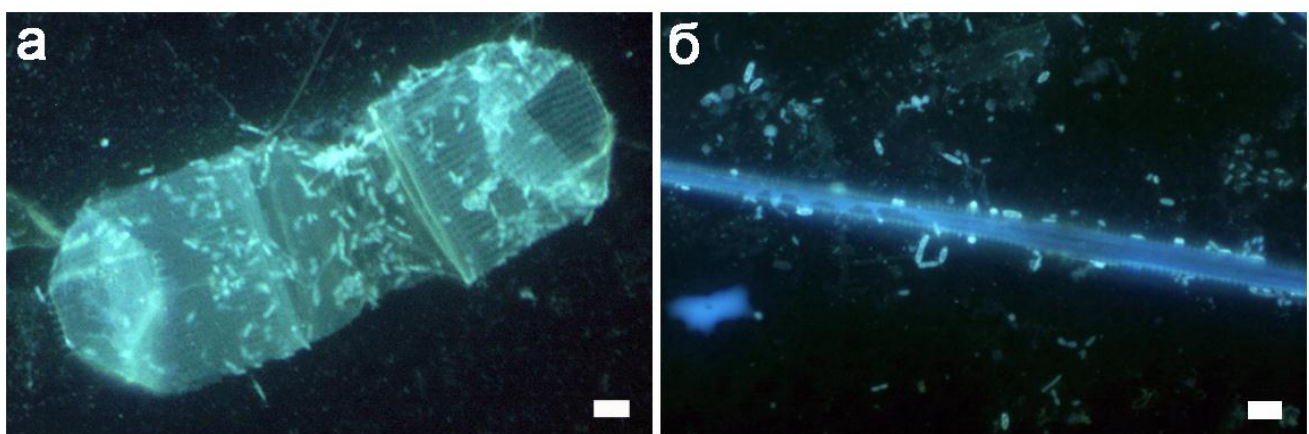


Рис. 5. Бактерии, ассоциированные с диатомеями *A. islandica* (а) и *F. radians* (б) в подледных микробных сообществах оз. Байкал, эпифлуоресцентная микроскопия, окраска ДАФИ. Масштаб – 5 мкм.

Из подледных сообществ получена коллекция чистых культур из 150 штаммов. Для таксономической идентификации было выбрано 11 штаммов,

обладающих множественной ферментативной активностью – казеиназной, желатиназной, амилолитической, фосфолипазной и каталазной. С помощью секвенирования гена 16S рРНК и последующего филогенетического анализа установлено, что выделенные штаммы относятся к *Brevundimonas aurantiaca*, *B. nasdae*, *Pseudomonas japonica*, *P. baetica*, *Janthinobacterium lividum*, *Rhodococcus fascians*, *Methylobacterium extorquens*, *Knoellia* sp., *Sphingomonas* sp. и *Roseomonas* sp. Ближайшие родственники полученных штаммов были ранее изолированы из холодных мест обитания, процент идентичности составляет не менее 99 %, за исключением штамма SI_38 (97 % идентичности) (рис. 6).

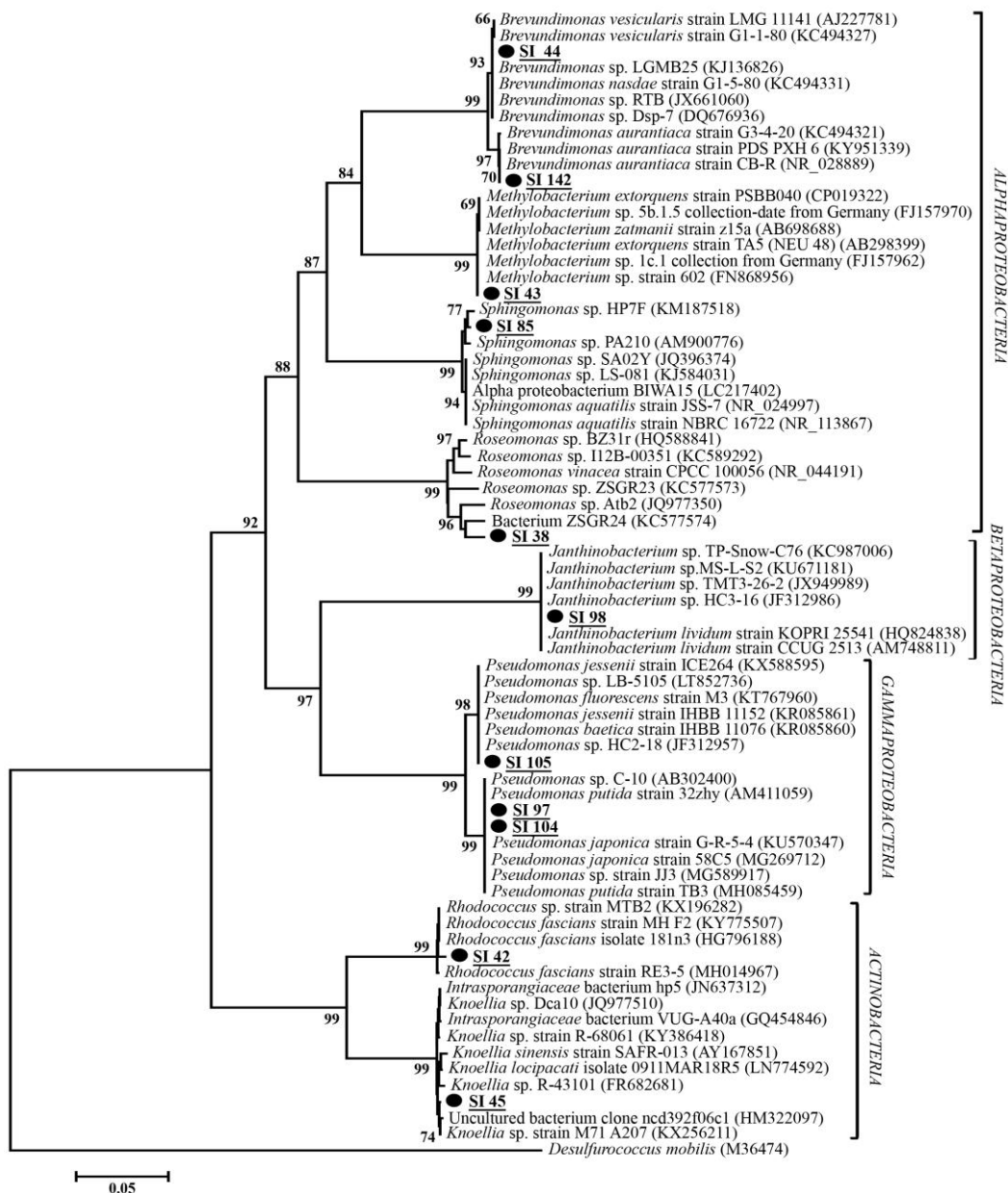


Рис. 6. Филогенетическое дерево методом объединения ближайших соседей на основе нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК бактериальных штаммов из подледных микробных сообществ озера Байкал. Последовательности полученных штаммов выделены и подчеркнуты.

ГЛАВА 5. ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА, БОГАТСТВО И РАЗНООБРАЗИЕ ПОДЛЕДНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ ЮЖНОГО БАЙКАЛА ПО ДАННЫМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА 16S рРНК

В результате первичной обработки данных 24 образцов из подледных сообществ, 3 образцов из сообществ подледной воды и 4 образцов из фотического слоя в весенний период в общей сложности получено 183424 последовательности, относящиеся к домену *Bacteria*. Количество последовательностей варьировало от 1171 до 27099 на образец. В сообществах 2011 г. выявлено 6831 ОТЕ с генетической дистанцией 0,03, количество ОТЕ на образец варьировало от 466 до 2611. По данным индексов Chao1 и ACE биоразнообразие сообществ снижалось от марта к апрелю, значения индексов варьировало от 2772 до 6404 и от 4162 до 10721 соответственно. В сообществах 2013 г. выявлено 515 ОТЕ с генетической дистанцией 0,03, количество ОТЕ на образец варьировало от 86 до 289. По данным индексов Chao1 и ACE, наибольшее разнообразие в сообществах, развивающихся в конце февраля во всех зонах (от 203 до 329 и от 294 до 372), к середине марта разнообразие снижалось (от 141 до 160 и от 132 до 177), а к концу марта снова увеличивалось, и в мае достигало максимальных значений (от 391 до 553 и от 353 до 644). В сообществах 2015 г. выявлено 489 ОТЕ_{0,03}, количество ОТЕ на образец варьировало от 105 до 440. По данным индексов Chao1 и ACE, биоразнообразие сообществ было выше по сравнению с 2013 г., значения индексов варьировали от 205 до 409 и от 214 до 524 соответственно.

В подледных бактериальных сообществах озера Байкал преобладали представители пяти филумов *Proteobacteria* (27 % от общего количества последовательностей), *Bacteroidetes* (18 %), *Cyanobacteria* (18 %), *Actinobacteria* (14 %) и *Verrucomicrobia* (13 %) (рис. 7). Соотношение филумов варьировало на протяжении одного ледового сезона, имело межгодовую динамику и изменялось в разных экологических зонах. Наиболее обильные ОТЕ относились к родам *Flavobacterium*, *Massilia*, *Rhodoferrax*, *Pseudomonas*, *Candidatus Methylophilum* и неклассифицированным *Cyanobacteria*. Ближайшие родственники (идентичность 98–100 %) наиболее обильных ОТЕ изолированы из различных биотопов, в том числе из холодных мест обитания, таких как вечная мерзлота, снег, лед, антарктическая почва. Основной вклад в состав бактериальных сообществ подледной воды вносили три филума *Actinobacteria* (37 %), *Proteobacteria* (24 %) и *Verrucomicrobia* (21 %), а в сообществах фотического слоя в весенний период –

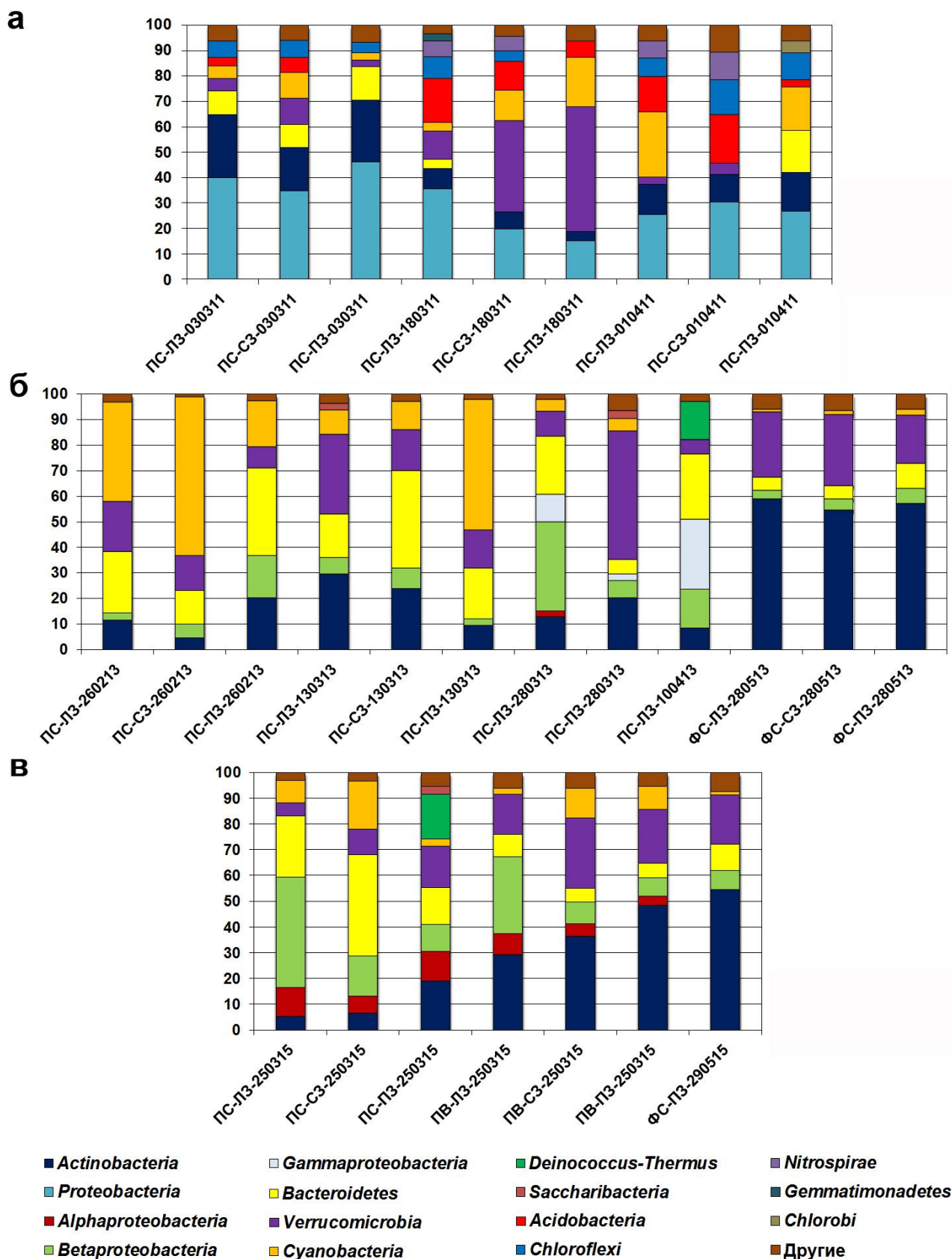


Рис. 7. Таксономический состав подледных бактериальных сообществ и сообществ фотического слоя в весенний период в 2011 (а), 2013 (б) и 2015 гг. (в) на уровне филумов, доля в сообществе которых выше 2 %. ПС – подледные сообщества; ПВ – подледная вода; ФС – фотический слой; ЛЗ – литоральная зона; СЗ – склоновая зона; ПЗ – пелагическая зона.

Actinobacteria (56 %) и *Verrucomicrobia* (21 %). Показаны различия в структуре подледных сообществ, сообществ подледной воды и фотического слоя в весенний период, характеризующиеся различным соотношением доминирующих таксонов в исследуемых сообществах.

ГЛАВА 6. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ ПОДЛЕДНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ

Сравнительный анализ с помощью метода РСоА (Principal Coordinates Analysis) и кластерного анализа с использованием индекса Брея–Кёртиса показал сходство сообществ бактерий, отобранных в один период времени, структура сообществ не зависела от экологической зоны и от состава микроводорослей (рис. 8, 9). На плоте образцы 2011 г. формировали две группы (рис. 8). Первую группу образовывали три образца из сообществ начала марта (ПС-ЛЗ-030311, ПС-СЗ-030311, ПС-ПЗ-030311), вторую группу формировали пять образцов из сообществ середины марта и начала апреля (ПС-ЛЗ-180311, ПС-СЗ-180311, ПС-ПЗ-180311, ПС-ЛЗ-010411, ПС-СЗ-010411). При сравнении подледных сообществ 2013 и 2015 гг. с сообществами подледной воды 2015 г. и фотического слоя в 2013 и 2015 гг. методом РСоА и кластерным анализом с помощью индекса Брея–Кёртиса выявлено значительное отличие в сообществах ледового периода и периода открытой воды (рис. 9). Как и в сообществах 2011 г. на РСоА плоте образцы подледных сообществ 2013 и 2015 гг. формировали две группы:

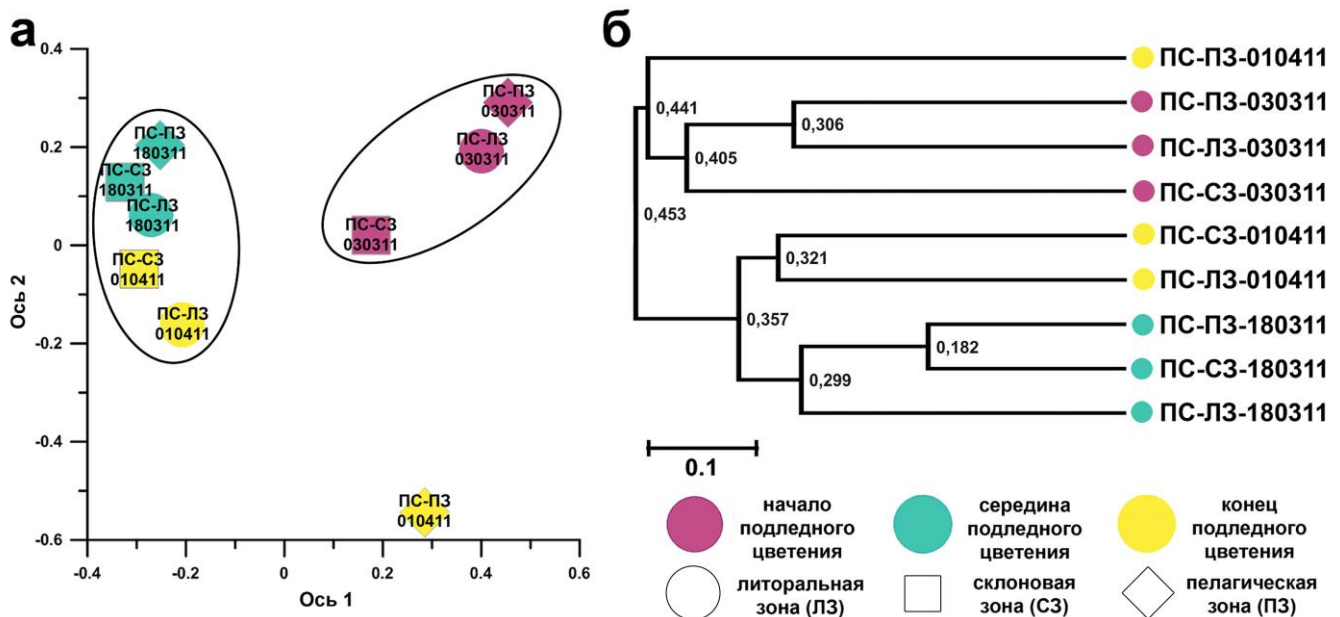


Рис. 8. Сравнительный анализ подледных бактериальных сообществ 2011 г. РСоА плот и UPGMA-дендрограмма построены на основе представленности ОТЕ с генетической дистанцией 0,03 с использованием индекса сходства Брея–Кёртиса.

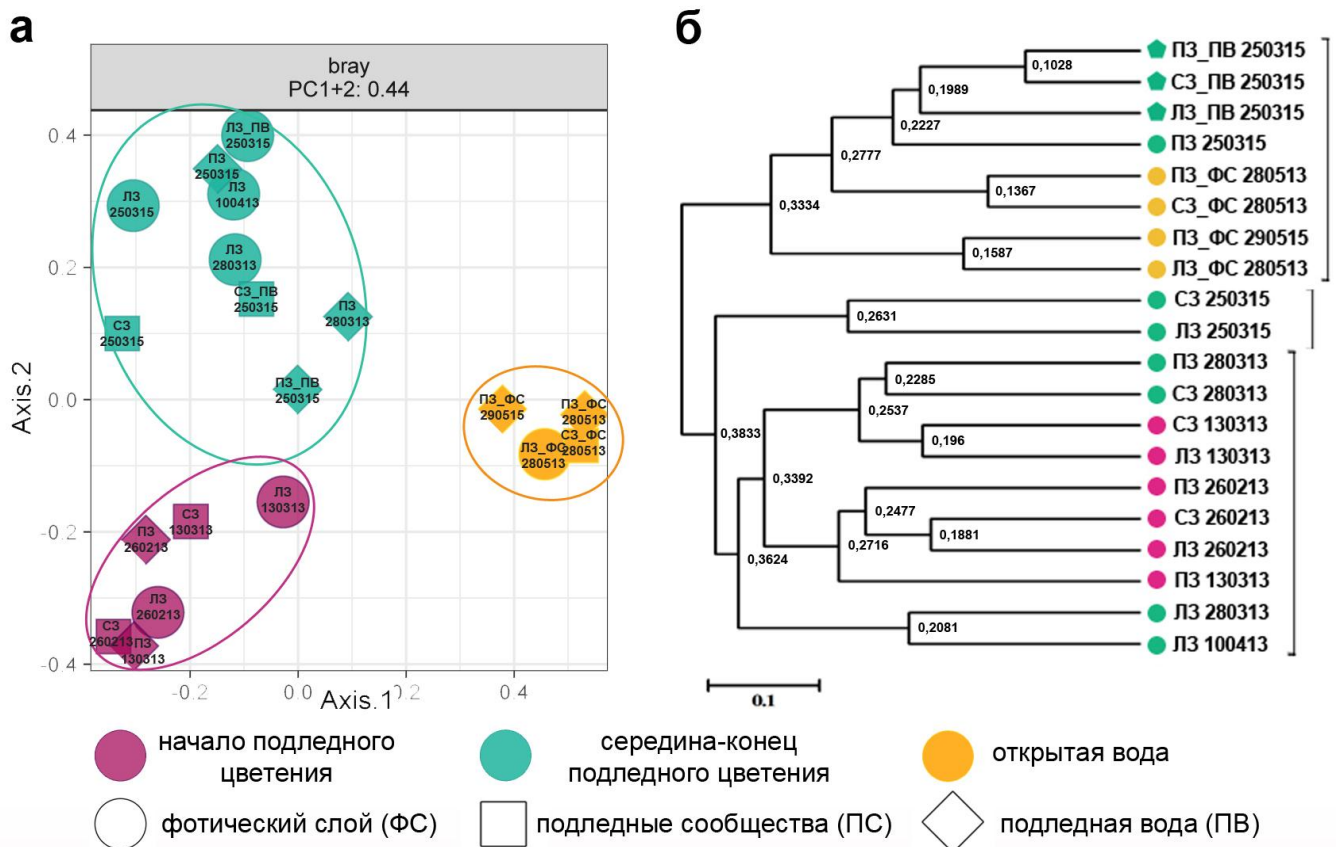


Рис. 9. Сравнительный анализ подледных бактериальных сообществ, сообществ подледной воды (ПВ) и фотического слоя (ФС) в весенний период методом РСоА и кластерным анализом с использованием индекса сходства Брея–Кёртиса.

сообщества, развивающиеся в начале цветения и сообщества середины и конца подледного цветения. Третью группу формировали образцы фотического слоя весеннего периода. На дендрограмме сформировались два кластера (рис. 9б). В первый кластер вошли сообщества подледной воды, фотического слоя и один образец подледных сообществ ПС-ПЗ-250315. Во второй вошли образцы из подледных сообществ.

Статистический анализ методом NMDS с дистанцией Брея–Кёртиса между структурой бактериальных сообществ, типом сообществ (ПС, ПВ, ФС), периодом развития (начало подледного цветения, середина-конец, период открытой воды), зоной (ЛЗ, СЗ, ПЗ) и развивающимися в сообществе типами микроводорослей (Bacillariophyta, Dynophyta, Chlorophyta, Chrysophyta и Cryptophyta) показал, что к наиболее значимым параметрам (с высоким коэффициентом детерминации (r^2) и значением p -value $\leq 0,001$) относятся период развития сообществ ($r^2 = 0,5613$) и тип микроводорослей ($r^2 = 0,6710$), что говорит об их взаимосвязи со структурой бактериальных сообществ (рис. 10).

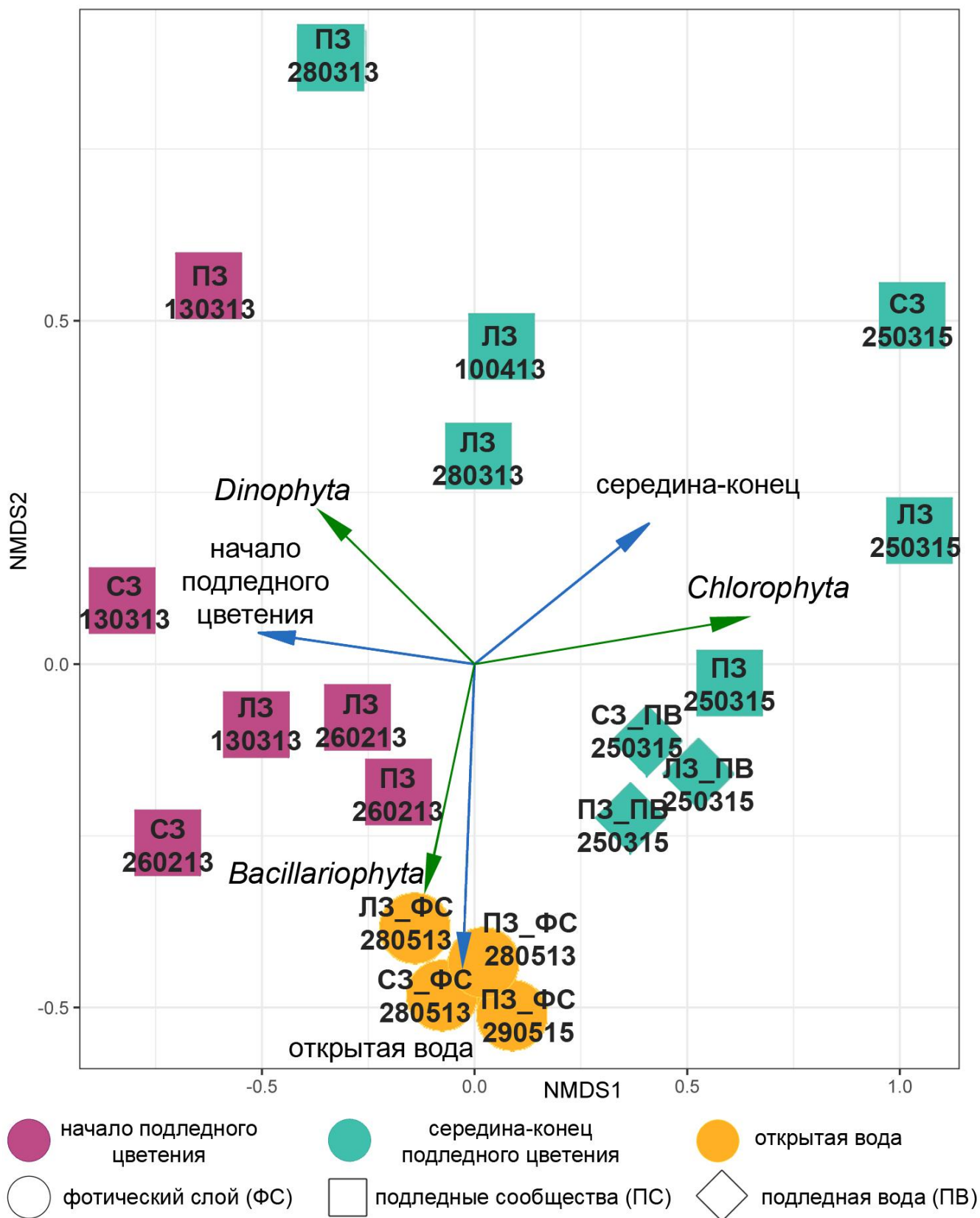


Рис. 10. NMDS плот, показывающий взаимосвязь между структурой бактериальных сообществ, периодом развития сообществ и доминирующей группой микроводорослей по данным 2013 и 2015 гг. Стресс значение = 0.15.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено исследование микробных сообществ, развивающихся на границе раздела фаз «лед – вода» в озере Байкал с применением комплекса микроскопических, микробиологических и молекулярно-генетических методов. Показано, что видовой состав микроводорослей, их численность и биомасса изменяются в течение одного ледового сезона, различаются по годам и по экологическим зонам (литоральная, пелагическая и склоновая зоны). Формируется несколько типов сообществ, характеризующихся различным составом доминирующих видов микроводорослей: диатомей *Aulacoseira baicalensis*, *A. islandica*, *Fragilaria radians*, *Ulnaria danica*; динофлагеллят *Gymnodinium baicalense*, *Peridinium eurycaps* и зеленой микроводоросли *Chlorella* sp. Выявлено, что состав доминирующих таксонов микроводорослей подледных микробных сообществ отличается от сообществ подледной воды и фотического слоя в период открытой воды.
2. В подледных микробных сообществах озера Байкал общая численность бактерий и численность культивируемых органотрофов увеличиваются на протяжении ледового периода и на порядок выше, чем в сообществах подледной воды и сообществах фотического слоя в период открытой воды. Максимальная численность бактерий выявлена в подледных микробных сообществах с доминированием диатомей *Aulacoseira islandica*.
3. Культивируемые бактерии из подледных микробных сообществ представлены психротолерантными гетеротрофами и отнесены на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рНК к *Brevundimonas nasdae*, *B. aurantiaca*, *Rhodococcus fascians*, *Methylobacterium extorquens*, *Pseudomonas jessenii*, *P. japonica*, *Janthinobacterium lividum*, *Roseomonas* sp., *Knoellia* sp. и *Sphingomonas* sp.
4. Выявлено высокое биоразнообразие подледных бактериальных сообществ с максимальными значениями индексов богатства и разнообразия в начале подледного развития. Показаны межгодовые и внутрисезонные изменения в биоразнообразии и структуре подледных бактериальных сообществ.
5. В составе подледных бактериальных сообществ выявлен 21 филум с доминированием *Proteobacteria* (26,8 % от общего количества последовательностей), *Bacteroidetes* (17,9 %), *Cyanobacteria* (17,7 %),

Actinobacteria (14 %) и *Verrucomicrobia* (12,7 %), доля которых в разных сообществах варьирует по экологическим зонам и времени развития.

6. Таксономический состав различен в подледных бактериальных сообществах, сообществах подледной воды и периода открытой воды. Выявлены филотипы, представленные только в подледных сообществах, которые отнесены к *Caulobacteriaceae*, *Oxalobacteraceae*, *Deinococcaceae*, *Micrococcaceae*, Family_XII и un_Alphaproteobacteria. Филотипы, представленные во всех исследуемых сообществах, образуют ядро сообществ, отнесены к *Acidimicrobiaceae*, *Sporichthyaceae*, *Comamonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Chitinophagaceae*, OPB35_soil_group, un_Saccharibacteria, SL56_marine_group и Subgroup_6.

7. Динамичные условия среды на границе раздела фаз «лед – вода» влияют на структуру подледных бактериальных сообществ, которая изменяется в короткий промежуток времени. Состав подледных микробных сообществ, сообществ подледной воды и фотического слоя в весенний период связан с периодом развития и с доминирующими таксонами микроводорослей.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Bashenkhaeva M.V.**, Zakharova Yu.R., Petrova D.P., Khanaev I.V., Galachyants Yu.P., Likhoshway Ye.V. Sub-ice Microalgal and Bacterial Communities in Freshwater Lake Baikal, Russia // *Microbial Ecology*. – 2015. – V. 70, №. 3. – P. 751–765.

2. **Башенхаева М.В.**, Захарова Ю.Р., Галачьянц Ю.П., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В. Сообщества бактерий в период массового подледного развития динофлагеллят в озере Байкал // *Микробиология*. – 2017. – Т. 86, № 4. – С. 510–519.

3. **Башенхаева М.В.**, Захарова Ю.Р. Культивируемые бактерии из подледных альго-бактериальных сообществ озера Байкал // *Acta Biologica Sibirica*. – 2017. – Т. 3, № 3. – С. 77–86.

В материалах конференций:

1. **Башенхаева М.В.**, Шишлянников С.М., Захарова Ю.Р., Лихошвай Е.В. Сравнительный анализ ассоциаций бактерий с диатомовыми сообществами озера Байкал в период подледного цветения при помощи световой и

эпифлуоресцентной микроскопии // 5-ая Верещагинская Байкальская конференция (Иркутск, 4-9 октября, 2010). – Иркутск, 2010. – С. 90–92.

2. **Башенхаева М.В.**, Петрова Д.П., Захарова Ю.Р., Волокитина Н.А., Шишлянников М.С. Изучение развития альго-бактериальных подледных сообществ Южного Байкала (падь Варначка) методами световой, эпифлуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии в весенний период 2011 года // Материалы 3-го Байкальского Микробиологического симпозиума с межд. участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» BSM-2011 (Иркутск, 3–8 октября, 2011). – Иркутск, 2011. – С. 152.

3. **Башенхаева М.В.** Подледные альго-бактериальные сообщества Южного Байкала: динамика развития и пространственное распределение // Материалы XX Межд. научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2013» (Москва, 8–13 апреля, 2013). – Москва, 2013. – С. 98–99.

4. **Башенхаева М.В.**, Захарова Ю.Р., Петрова Д.П., Галачьянц Ю.П., Ханаев И.В. Исследование подледных альго-бактериальных сообществ Южного Байкала // Сборник тезисов VI Всероссийского с межд. участием Конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 19–23 августа, 2013). – Иркутск, 2013. – С. 131–133.

5. **Bashenkhaeva M.V.** Sub-ice microbial communities of freshwater Lake Baikal: dynamics, structure and biodiversity // 4-th International Student Conference on Microbial Communication (Jena, Germany, 31 March–3 April, 2014). – Jena, 2014. – С. 62.

6. Zakharova Yu.R., **Bashenkhaeva M.V.**, Petrova D.P., Galachyants Yu.P., Khanaev I.V., Likhoshway Ye.V. Sub-Ice Microbial Assemblages of Lake Baikal (Eastern Siberia, Russia) // 10th International Congress on Extremophiles (Санкт-Петербург, 06–11 сентября, 2014). – Санкт-Петербург, 2014. – С. 136.

7. **Bashenkhaeva M.V.**, Y. Zakharova, Y. Galachyants, I. Khanaev. Biodiversity of sub-ice microbial communities in southern Baikal // 9th Symposium of European Freshwater Sciences - SEFS 9 (Unimail, Geneva, Switzerland, 5–10 July, 2015). – Unimail, 2015. – С. 275.

8. **Bashenkhaeva M.V.**, Zakharova Y.R., Khanaev I.V. Psychrophilic bacteria in sub-ice communities of Lake Baikal // Goldschmidt 2015 (Praga, Czech Republic, 16–21 August, 2015). – Praga, 2015. – С. 221.

9. **Башенхаева М.В.**, Захарова Ю.Р., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В. Структурно-функциональные характеристики подледных сообществ из озера Байкал // Материалы 4-го Байкальского микробиологического симпозиума с межд. участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» BSM-2015 (Иркутск, 7–12 сентября, 2015). – Иркутск, 2015. – С. 249–250.

10. **Башенхаева М.В.**, Захарова Ю.Р., Галачьянц Ю.П., Ханаев И.В., Лихошвай Е.В. Сравнительный анализ бактериальных сообществ озера Байкал в подледный период и период открытой воды // II Всероссийская конференция с межд. участием (Новосибирск, 18–23 июня, 2017). – Новосибирск, Acta Naturae. – 2017. – Т. 9 спецвыпуск. – С. 30.

11. **Башенхаева М.В.**, Захарова Ю.Р., Петрова Д.П., Галачьянц Ю.П., Ханаев И.В., Сакирко М.В., Лихошвай Е.В. Подледные микробные сообщества озера Байкал // Сборник тезисов 1-го Российского Микробиологического конгресса (Пушино, 17–18 октября, 2017). – Пушино, 2017. – С. 26.

БАШЕНХАЕВА Мария Викторовна
ПОДЛЕДНЫЕ МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ОЗЕРА БАЙКАЛ

Автореф. дис. на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Подписано к печати 24.12.2018 г.
Формат 60×84/16. Объем 1,4 п.л. Тираж 130 экз. Заказ № 849.
Издательство Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН.
664033 г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 1.

