

На правах рукописи

МАЛЬНИК Валерий Васильевич

**МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО БИОПЛЕНОК НА ПОВЕРХНОСТИ
РАЗДЕЛА ФАЗ «ВОДА – ТВЕРДОЕ ТЕЛО» ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЫ
ОЗ. БАЙКАЛ**

03.00.16 - экология
03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ – 2010

Работа выполнена в лаборатории водной микробиологии
Лимнологического института СО РАН

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Парфенова Валентина Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Бузолева Любовь Степановна
кандидат биологических наук
Дагурова Ольга Павловна

Ведущая организация: Институт водных и экологических проблем ДВО РАН

Защита диссертации состоится « 23 » апреля 2010г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.022.03 при Бурятском государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24 а, конференц-зал.

Факс: (3012)210588

E-mail: d21202203@mail.ru

malnik80@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и Бурятского государственного университета

Автореферат разослан « 22 » марта 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.А. Шорноева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Микробные сообщества – одни из наиболее значимых компонентов живого населения водоемов. Известно, что большая часть микроорганизмов образует биопленки, и более чем 99% всех микроорганизмов на Земле живут в таких агрегатах (Costerton et al., 1987). Ископаемые биопленки являются первыми записями жизни на Земле, датирующимися 3,5 млрд. лет назад (Schopf et al., 1983). Они представлены самой отдаленной наиболее успешной формой жизни при заселении почвы, осадков, минеральных и растительных поверхностей в природе, включая экстремальные местообитания, в том числе, такие как системы пор в ледниках, горячие источники, электроды и даже области, сильно облученные установками ядерной энергии (Satpathy, 1999).

Биопленки вовлекаются в биогеохимические пути круговорота углерода, азота, водорода, серы, фосфора и большей части металлов. Процессы самоочищения в природе совершаются также с участием биопленочных организмов, а биотехнология в очистке питьевой и сточных вод основывается на биопленках (Flemming, 2002). Но также они могут являться значительной помехой на искусственных структурах, таких как корабельные корпуса, гидроэлектрические трубопроводы, водные системы сетчатого строения и теплообменники (Marshall, 1992; Dworkin, 2006).

Изучение особенностей распространения биопленок в зависимости от локальных экологических условий (окружающая температура, наличие и доступность питательных веществ), определение таксономического разнообразия бактерий их сообщества вызывают интерес и привлекают внимание многих ученых. Актуальность и необходимость проведения исследований в данном направлении была оценена Европейским союзом микробиологов: на международном симпозиуме в рамках FEMS в 2009 году в Швеции был организован отдельный симпозиум ISME-FEMS Symposium – «Biofilms in Ecology and Medicine». Очевидно, что изучение разнообразия биопленочных микроорганизмов литоральной зоны оз. Байкал представляет несомненный

интерес для понимания механизмов функционирования экосистемы Байкала в целом.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – изучить количественный состав, морфологическое и таксономическое разнообразие микроорганизмов из сообщества биопленок литоральной зоны озера Байкал.

Для достижения этой цели были поставлены следующие основные задачи:

1. Исследовать количественный состав микроорганизмов, выделенных с биопленок каменных субстратов в мелководной литоральной зоне оз. Байкал.
2. Изучить морфологическое разнообразие микроорганизмов биопленочных образований на пластинках различного типа методами эпифлуоресцентной световой, а также сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии.
3. Выделить микроорганизмы из биопленок на стальной пластине, граните, мраморе и амфиболите методами классической микробиологии и сформировать коллекцию чистых культур, а также исследовать способность заселения микроорганизмами искусственных субстратов.
4. Определить ферментативную активность, физиолого-биохимические свойства, таксономический статус до рода культивируемых микроорганизмов биопленок.
5. Провести исследование таксономического разнообразия некультивируемого микробного сообщества биопленок (по гену *16S* рРНК) с использованием методов молекулярной биологии на основе филогенетического анализа.

Научная новизна работы. Впервые в озере Байкал было исследовано биопленочное сообщество микроорганизмов, развивающееся на поверхности раздела фаз «вода – твердое тело». Установлена избирательность заселения микроорганизмами различных субстратов, сделано предположение о возможной роли микроорганизмов в разрушении некоторых пород, типичных для литорали озера. Было показано, что микроорганизмы биопленок обладают достаточно высокой ферментативной активностью. Проведен количественный учет различных групп биопленочных бактерий в литоральной зоне оз. Байкал в районе пос. Большие Коты. Впервые для изучения биопленок озера Байкал использован

молекулярно-биологический подход. Сравнительный анализ генов рРНК позволил выявить в составе биопленок различные таксономические группы микроорганизмов. Получены данные по гену *16S* рРНК для микроорганизмов, входящих в состав биопленочных сообществ литоральной зоны оз. Байкал.

Практическая значимость работы Расширение сведений о составе биопленочных сообществ имеет большое практическое значение для обнаружения и выделения микроорганизмов, обладающих различной ферментативной активностью, а также для использования сформированной коллекции в биотехнологии. Полученные генетические данные, характеризующие разнообразие биопленочных сообществ оз. Байкал, позволяют сравнивать их с результатами исследования биопленок других пресноводных и соленых водоемов. Создан банк данных последовательностей фрагментов гена *16S* рРНК культивируемых и некультивируемых бактерий, 10 из них зарегистрированы в международном EMBL-банке данных. Полученные в ходе работы нуклеотидные последовательности могут служить основой в конструировании зондов для гибридизации.

На защиту выносятся следующие положения:

1. В литоральной зоне оз. Байкал на поверхности раздела фаз «вода – твердое тело» формируются специализированные микробные сообщества, входящие в состав биопленки.
2. Наличие разнообразных физиологических групп микроорганизмов, функционирующих в тесной связи друг с другом в биопленочных сообществах и обладающих широким спектром ферментативной активности, позволяет предполагать, что процессы деструкции органического вещества эффективно осуществляются биопленочными организмами.
3. В биопленочных сообществах литоральной зоны озера Байкал выявлены микроорганизмы различных филогенетических групп, большая часть которых представлена некультивируемыми формами.

Апробация работы. Основные результаты исследований представлены и обсуждены на следующих научных форумах: IV Верещагинской Байкальской Конференции, Иркутск, 2005; Всероссийской конференции с международным участием «Биоразнообразие Экосистем Внутренней Азии», Улан-Удэ, 2006; X Всероссийской научно-практической конференции «Научное Творчество Молодежи», Анжеро-Судженск, 2006; IX Съезде Гидробиологического общества РАН, Тольятти, 2006; VI международном симпозиуме «Terrestrial Environmental Changes In East Eurasia and Adjacent Areas», Иркутск-Листвянка, 2007; II Байкальском Микробиологическом Симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ», Иркутск, 2007;

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 11 печатных работ, в том числе одна статья, рекомендованная ВАК, и две главы в коллективной монографии.

Структура и объем работы. Данная диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, трех глав по содержанию исследования, заключения и выводов, списка использованной литературы (182 отечественных и зарубежных источника) и приложений. Объем работы составляет 137 страниц машинописного текста, включающего 5 таблиц, 28 рисунков и 4 приложения.

Благодарности. Автор выражает благодарность и искреннюю признательность за постоянную помощь и поддержку при выполнении работы научному руководителю – доценту, зав. лабораторией водной микробиологии к.б.н. Парфеновой В.В., зав. лабораторией биологии водных беспозвоночных д.б.н. Тимошкину О.А., зав. лабораторией биогеохимии к.г.-м.н. Сутуруину А.Н., к.г.-м.н. Бойко С.М., к.б.н. Ковадло А.С., к.б.н. Перетолчиной Т.Е., к.б.н. Кулаковой Н.В., д.б.н. Мизандронцеву И.Б., д.б.н. Беликову С.И., Старостину В.Ф., Егорову В.И. и всем сотрудникам лаборатории водной микробиологии Лимнологического института.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлись биопленочные сообщества микроорганизмов, обитающие на каменистых грунтах литоральной зоны озера Байкал, а также микроорганизмы, заселяющие амфиболитные, гранитные, мраморные, а также стальные пластины, погруженные в литоральной зоне озера. В работах многих авторов биопленки широко определяются как скопления микроорганизмов и их связанных внеклеточных продуктов на поверхности раздела фаз, типично прикрепленные к неживой или живой поверхности (Davey, 2000). Биопленки могут возникать на твердо-жидкой, твердо-воздушной и жидко-воздушной поверхностях раздела фаз (Flemming, 2002). Особенность, которую они все имеют, заключается в том, что организмы внедряются в матрикс микробного происхождения, состоящий из внеклеточных полимерных веществ. Внеклеточные полимерные вещества (ВПВ) содержат, главным образом, полисахариды и белки, которые формируют гидрогелевые матрицы (Wingender et al., 1999).

Материалы и методы исследований

С 2005 по 2009 год было отобрано и исследовано около 60 сезонных проб, взятых в районе междисциплинарного полигона у м. Березовый на Южном Байкале и в районе п. Большие Коты в период экспедиций, организованных ЛИН СО РАН. Эти пробы брались с установленных на дне литорали озера пластинок из нержавеющей стали, а также гранита, мрамора, амфиболита и неопределенных по минералогическому составу камней, выстилающих литоральную зону оз. Байкал.

Использовали стандартные в водной микробиологии методы культивирования микроорганизмов на твердых питательных средах. Для этого готовили серию разведений из природных образцов и засеивали методом прямого глубинного посева (Родина, 1965). Затем проводили отбор доминирующих колоний, пересев на пробирки со скошенным агаром и идентификацию микроорганизмов до рода с

помощью физиолого-биохимических тестов (на оксидазу, каталазную активность, желатиназу, фосфатазу, на среде Хью и Лейвсона и др.).

В работе были использованы методы сканирующей (Marshall, 1986b), трансмиссионной (Marshall, 1986b) и эпифлуоресцентной микроскопии (Zvyagintsev, 1962).

Применяли две методики выделения ДНК из биопленок (Шубенкова, 2005; Грачев, 2006). Трансформацию проводили согласно описанному ранее методу (Sambrook *et al.*, 1989). При использовании набора CloneJET™ PCR Cloning Kit учитывались все выросшие на LB-среде колонии, которые, как предполагалось, содержали фрагменты гена *16S* рРНК. Для сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей с известными в GenBank использовали пакет программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *16S* рРНК выравняли с помощью ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) и оптимизировали вручную, используя программу BioEdit (Hall, 1999).

Филогенетическое древо строили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) (Felsenstein, 1981), с помощью программы PhymI (Bevan *et al.*, 2005). Достоверность топологии древа оценивали с помощью непараметрического бутстрэпа. Для оценки генетических дистанций использовали модель нуклеотидных замен НКУ (Hasegawa *et al.*, 1985). Модель замен выбирали согласно jModelTest (Posada, 2008).

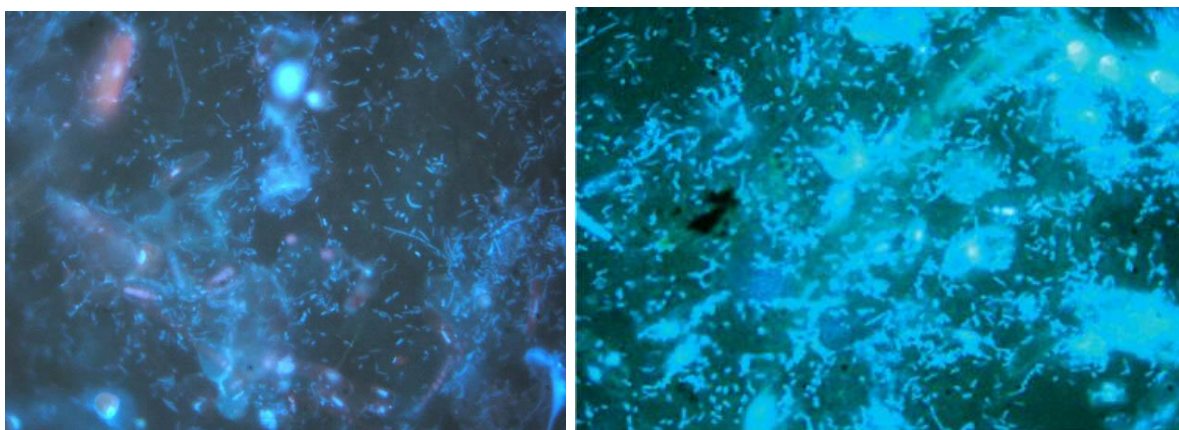
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Микробиологическая характеристика биопленок с природного каменного субстрата

Микроорганизмы в силу своего предпочтения прикрепленного образа жизни обеспечивают себе более благоприятные условия жизнедеятельности, участвуя в трансформации органического материала, осевшего на дно озера. В этом процессе участвуют все известные группы бактерий: сапрофиты, дрожжи, грибы,

актиномицеты, а также физиологические группы бактерий, участвующие в круговороте углерода, азота и фосфора (рис. 1 А, 1 Б).

Для поиска и количественной оценки вышеперечисленных бактерий проведен количественный и качественный анализ микробного сообщества биопленок, сформированных на каменном субстрате прибрежной зоны озера в районе Южного Байкала от п. Черная до п. Большие Коты в летнее время (Таблица 1).



А

Б

Рис. 7. Биопленочные микроорганизмы с природного каменного субстрата (А) и культивируемые на питательной среде (Б).

Анализ культивируемого микробного сообщества биопленок на каменном природном субстрате показал, что это сообщество состоит из большого разнообразия групп бактерий, численность каждой из этих групп составляет тысячи и сотни тысяч КОЕ/см² площади камня. Скорее всего, формирование микробного сообщества биопленок на природном субстрате зависит от минералогического состава поднятого каменного субстрата, от количества осевшего органического материала, от влияния гидрологических условий в мелководной зоне и некоторых других причин.

Таблица 1.

Количественные характеристики микроорганизмов (тыс. КОЕ/см²), обнаруженных на поднятых камнях в районе от п. Черная до п. Большие Коты.

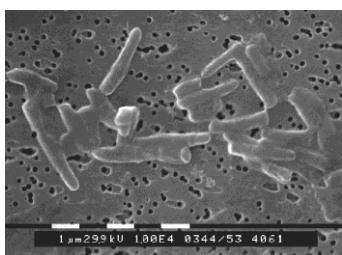
| Глубина | Сапрофиты | Дрожжи | Грибы и актиномицеты | Амилолитические | Фосфор-мобилизующие | Фосфат-растворяющие |
|----------------------|-----------|--------|----------------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| Падь Черная | | | | | | |
| 1 | 2 | 102 | 4 | 919 | 290 | 526 |
| 2 | 50 | 1480 | 0 | 628 | 104 | 236 |
| 3 | 15 | 94 | 5 | 25 | 4 | 2.4 |
| 500м от пади Черная | | | | | | |
| 0.5 | 12 | 0 | 1.5 | 1.4 | 4.6 | 0 |
| 1 | 0.2 | 10 | 1.5 | 557 | 0 | 0 |
| 1.8 | 3 | 0 | 0 | 680 | 0 | 0 |
| 3.2 | 160 | 94 | 2 | 219 | 0 | 0 |
| 1000м от пади Черная | | | | | | |
| 0.5 | 0.1 | 27 | 2.5 | 679 | 263 | 377 |
| 1 | 3.5 | 91 | 4 | 325 | 157 | 250 |
| 2 | 24.2 | 33 | 0.5 | 15.2 | 157 | 2.4 |
| 3 | 1.7 | 22 | 0 | сп.р | 0 | 314 |
| 1500м от пади Черная | | | | | | |
| 0.5 | 2.6 | 3 | 2.5 | 244 | 204 | 110 |
| 1 | 0.4 | 6 | 6.5 | 0 | 100 | 31.4 |
| 2 | 1.3 | 36.4 | 0 | 49 | 100 | 31.4 |
| 3 | 0.3 | 35.5 | 11 | 1570 | 0 | 0 |
| 2000м от пади Черная | | | | | | |
| 0.5 | 2.3 | 8 | 6.5 | 1624 | 0 | 0 |
| 1 | 0.2 | 117 | 2.5 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0.2 | 14.7 | 5 | 2747 | 0 | 0 |
| 3 | 2.4 | 7.9 | 0.5 | 357 | 0 | 0 |
| 2500м от пади Черная | | | | | | |
| 0.5 | 36 | 6 | 2 | 2.5 | 0.25 | 0 |
| 1 | 0.3 | 0.6 | 6.5 | 118 | 98 | 103 |
| 2 | 22 | 7.5 | 4 | 11.7 | 9.3 | 8.5 |
| 3000м от пади Черная | | | | | | |
| 0.5 | 38 | 5 | 1 | 785 | 102 | 86 |
| 1 | 0.2 | 10 | 0.5 | 188 | 0 | 0 |
| 3 | 193 | 2 | 3 | 157 | 0 | 0 |

2. Сравнительная характеристика микробного сообщества биопленок, сформированных на стальной пластине и пластинах различного минералогического состава

Как было упомянуто в работе, количественный состав различных групп микроорганизмов на каменном субстрате различался. Мы предположили, что

это может зависеть и от состава субстрата, на котором идет формирование биопленки.

Прямое наблюдение биопленок с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показало, что все три типа исследованных пластинок, заселяются различными группами микроорганизмов: на мраморе доминируют крупные палочки (рис. 1 А), на граните – палочки крупные и более мелкого размера и кокки (рис. 1 Б), на амфиболите – палочки и крупные кокковидные клетки (рис. 1 В)



А



Б



В

Рис. 1. Морфологическое разнообразие микроорганизмов на различных субстратах, выявленное методом сканирующей электронной микроскопии: А – на мраморе, Б – на граните, В – на амфиболите.

Микроорганизмы, которые прикреплялись к стальной пластине, по морфологической составляющей были более разнообразными, нежели на пластинах упомянутых выше субстратов (рис. 2). Это палочки разной длины и размеров, в том числе прямые и изогнутые, кокковые формы, а также спирали.

Кроме того, для описания морфологической структуры микроорганизмов использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Биопленка, сформированная на стальной пластине, показала большое морфологическое разнообразие микроорганизмов – палочки различной морфологической структуры, кокковидные клетки, простекобактерии и т.д. (рис. 3).

Также производился подсчет общей численности микроорганизмов на 1 см² стальной пластины, снятой вблизи берега у поселка Б. Коты. Численность составила 420 тыс. клеток.

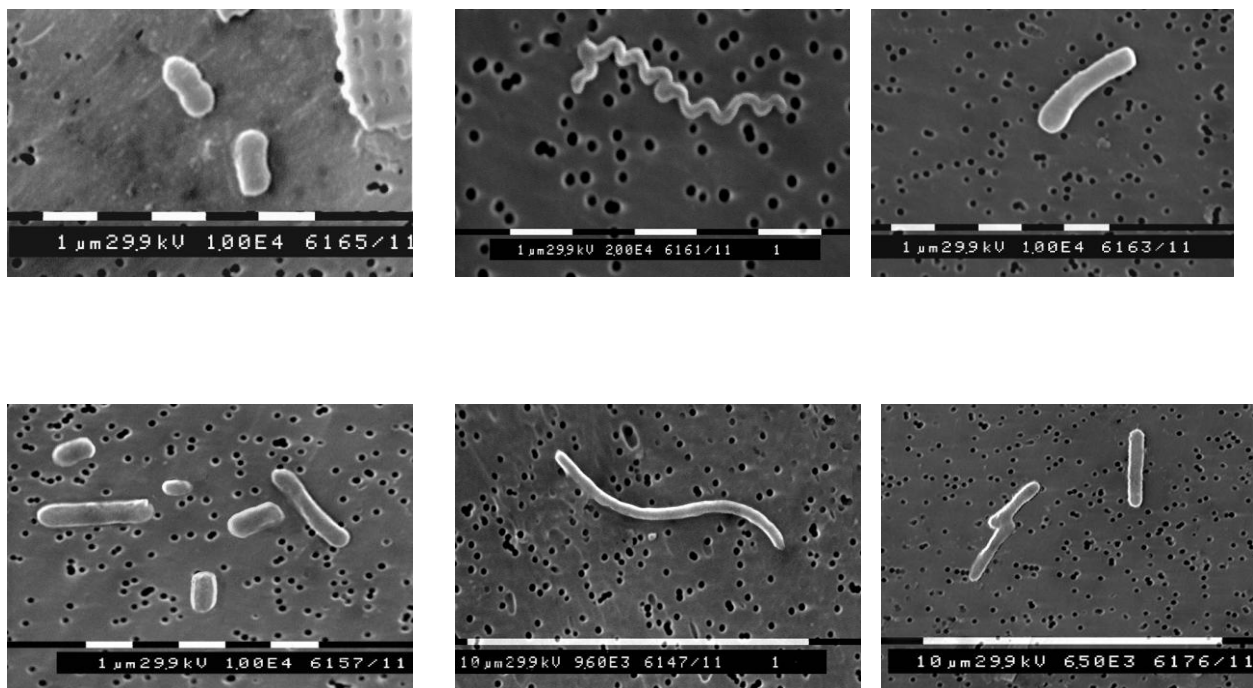


Рис. 2. Морфологическое разнообразие микроорганизмов биопленки со стальной пластины (СЭМ)

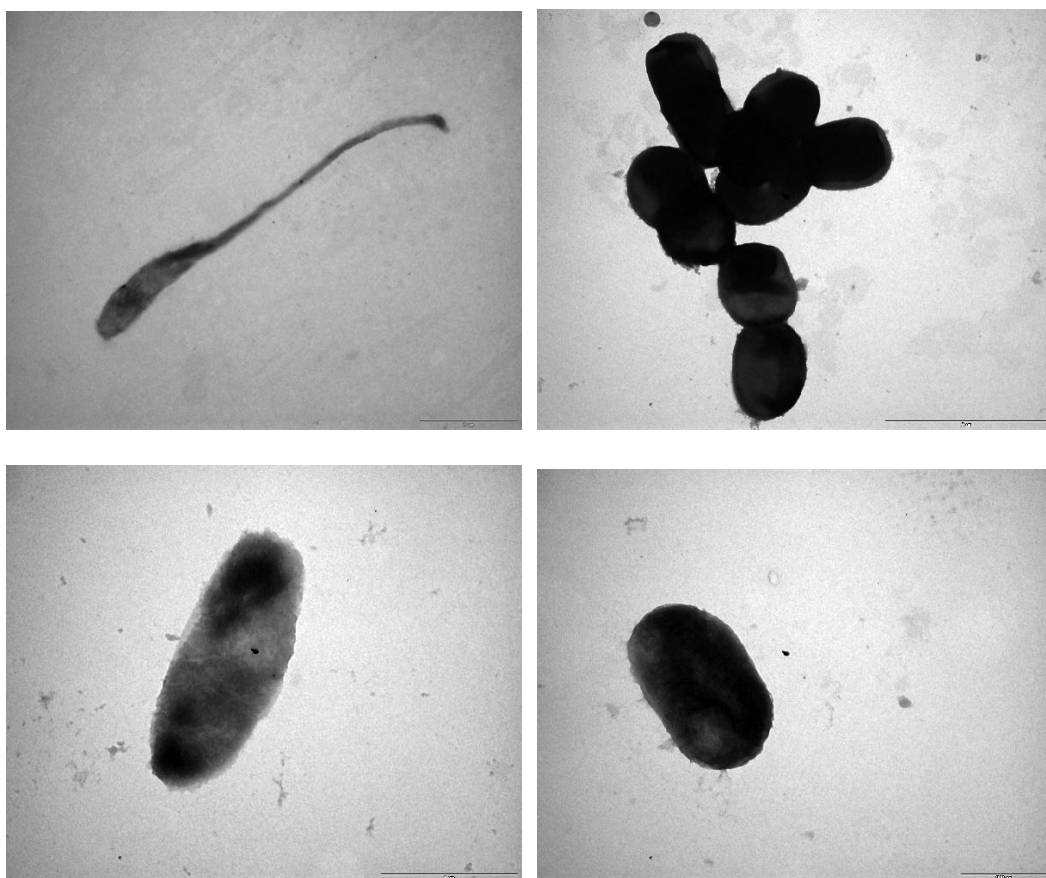


Рис. 3. Клетки биопленочных микроорганизмов, обнаруженных на стальной пластине (ТЭМ)

Для изучения морфологического разнообразия культивируемых микроорганизмов также использовали метод эпифлуоресцентной микроскопии (рис. 4).

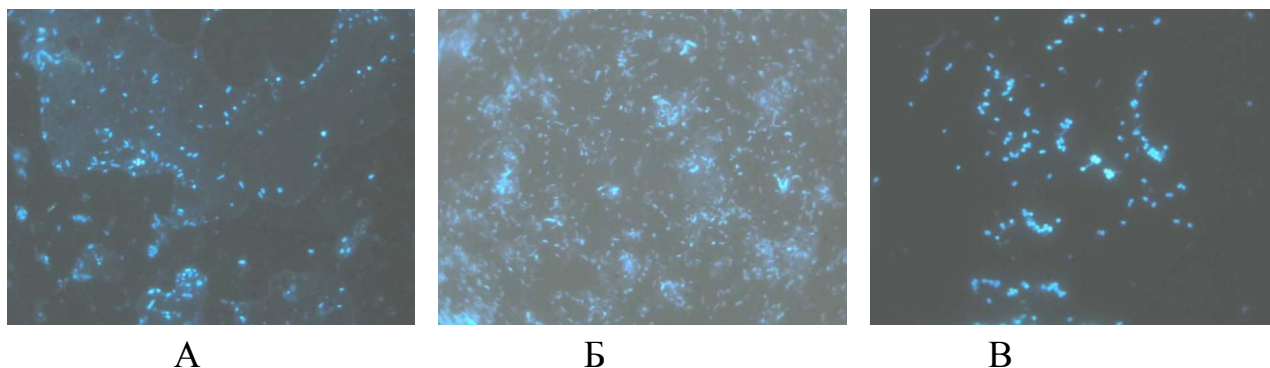


Рис. 4. Морфологическое разнообразие культивируемого микробного сообщества на различных субстратах, выявленное методом эпифлуоресцентной микроскопии: А – на граните, Б – на мраморе, В – на амфиболите.

На мраморе морфологическое разнообразие культивируемого микробного сообщества представлено одними палочковидными формами микроорганизмов различного размера (рис. 4Б). На граните и на амфиболите это были как палочковидные, так и кокковидные формы бактерий, причем на амфиболите кокковых форм было больше (рис. 4 А; В).

3. Физиолого-биохимическая активность и таксономический состав культивируемых микроорганизмов, изолированных из биопленок

Нами были изолированы колонии доминирующих микроорганизмов, которые выросли на разных питательных средах: наибольшее разнообразие выявлено на мраморе и стальной пластине – 50 и 58 различных штаммов, соответственно, с гранитной пластины было выделено 30, с амфиболитной – всего 9 штаммов. Изучение ферментативной активности изолированных штаммов показало, что микроорганизмы проявили все тестируемые активности (рис. 5).

У выделенных культур микроорганизмов из биопленки с гранитной пластины большая часть штаммов обладала амилазной и лецитиназной активностью. Выделенные штаммы с мраморной пластины чаще всего обладали лецитиназной и протеазной активностью. Микроорганизмы, выделенные со

стальной пластины, имели выраженные амилазные и липазные активности. У микроорганизмов, выделенных с биопленки амфиболита, ферментативные активности были развиты довольно слабо (у культур проявлялась активность не более 1 фермента).

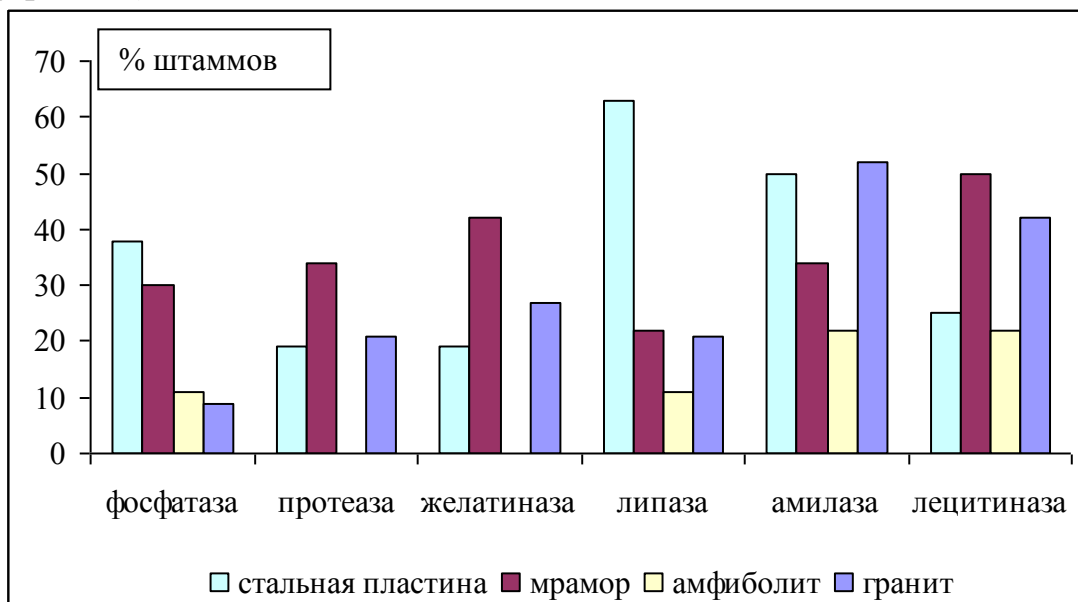


Рис. 5. Ферментативная активность культивируемых микроорганизмов, изолированных из биопленок с различных пластин (по оси Y – процент культур, из общего числа изолированных, обладающих той или иной ферментативной активностью).

Было проведено исследование по сравнению активностей микроорганизмов, ведущих планктонный образ жизни и прикрепленных в биопленке, образованной на стальной пластине. Определялись такие группы микроорганизмов как сапрофиты и олиготрофы, психрофилы, амилолитики, силикатрастворяющие бактерии, аммонификаторы, а также протеолитики (рис. 6).

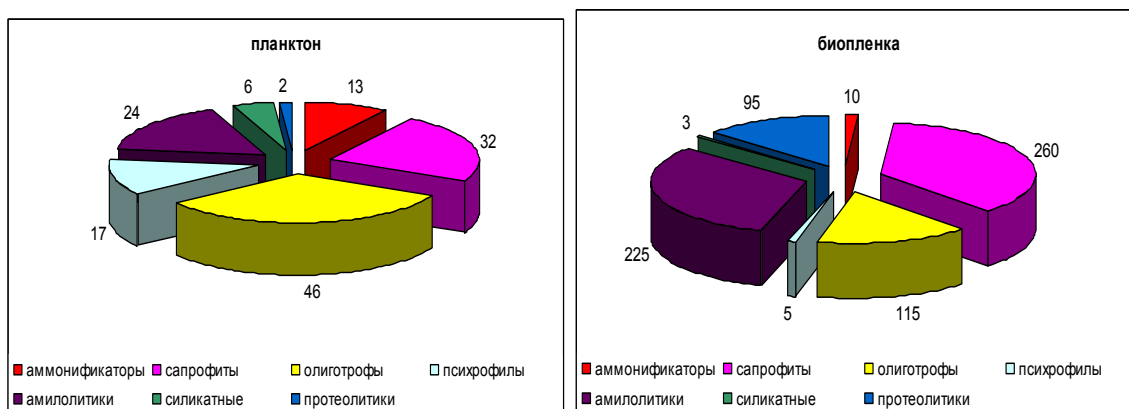


Рис. 6. Соотношение различных групп микроорганизмов в планктоне (КОЕ/мл) и биопленке (КОЕ10²/см²).

Анализ результатов показал, что в составе биопленки активно развиваются все исследованные физиологические группы микроорганизмов. Они присутствуют и в бактериопланктоне, но в очень малом количестве. Выявлено, что как в биопленочной, так и в планктонной пробе, преобладающими были сапрофитные и амилолитические микроорганизмы. В обоих случаях значительная часть выявленных микроорганизмов относилась к олиготрофам.

Определение таксономического состава изолированных бактерий до рода проводили по следующим признакам: окраска колоний и флуоресценция, морфологическое строение клетки, окраска по Граму, подвижность, определение оксидации и ферментации на среде Хью и Лейвсона, спорообразование, оксидазная, каталазная и протеолитическая (разжижение желатины) активность. Идентификацию проводили по морфологическим и физиолого-биохимическим признакам штаммов с использованием определителя Берджи (Хоулт и др., 1997).

В ходе проведенных тестов в биопленках на пластинках было идентифицировано 5 доминирующих родов микроорганизмов: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes*, *Aureobacterium*, а дополнительные исследования позволили выявить представителей рода *Streptococcus* и *Bacillus*.

4. Формирование биопленки в условиях лабораторного эксперимента

Биопленки выращивали на покровных микроскопических стеклах (18 мм x 18 мм), прикрепленных к предметным. Стекля во время эксперимента находились в вертикальном положении; перед анализом их промывали стерильной водой для удаления случайно осевших клеток. В качестве источника микроорганизмов для образования биопленки использовали байкальскую воду, отобранную в литоральной зоне озера. Для того чтобы выявить влияние различных факторов на формирование биопленки, были созданы различные условия культивирования: 1 вариант – байкальская вода и 0.01 % пептона и 0.01 % дрожжевого экстракта; 2 вариант – байкальская вода и 0.1 % пептона и 0.1 % дрожжевого экстракта, 3 вариант – байкальская вода без добавления питательных компонентов. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную воду, а положительным

контролем служила монокультура бактерий рода *Caulobacter*, которые способны формировать биопленки. Биопленки выращивали при комнатной температуре 22⁰С на свету.

По полученным данным установлено, что при отсутствии питательных веществ биопленка образуется достаточно долго и структура ее оказывается неплотной, внеклеточных полимерных веществ в ней мало. При добавлении небольших (олиготрофных) концентраций питательных веществ биопленка развивается более быстрыми темпами – наряду с одиночными клетками образуются микроколонии (рис. 7А), а затем формируется зрелая биопленка с внеклеточным полимерным матриксом (рис. 7Б). При добавлении значимых концентраций питательных веществ уже на пятые сутки образуется зрелая биопленка, к 10 суткам таковая структура начинает деградировать – часть клеток попадает в жидкую среду, отделяясь от биопленки.

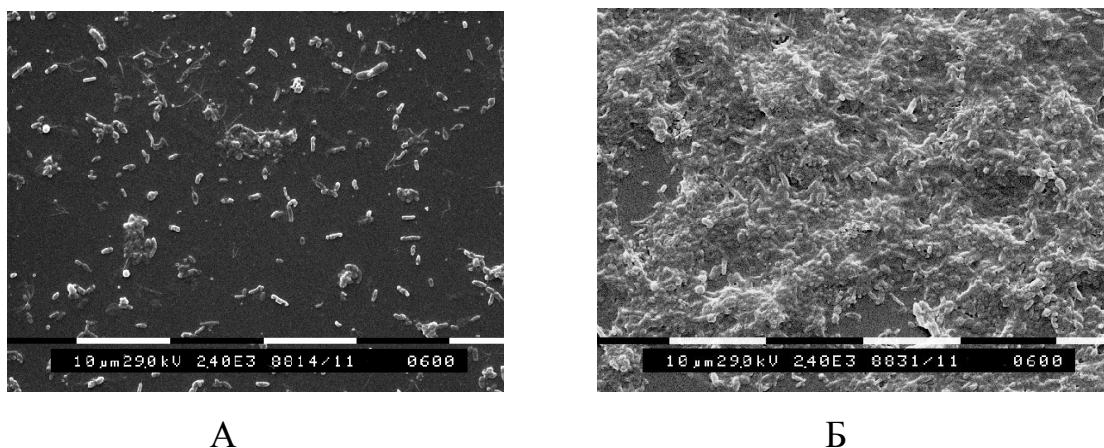


Рис. 7. Формирование биопленки после 10 дней культивирования (СЭМ)

Необходимо отметить, что при добавлении 0.01 % пептона и 0.01 % дрожжевого экстракта к байкальской воде формирование зрелой биопленки происходило лишь на 8-10 сутки, а в случае отсутствия дополнительных питательных веществ к исходу 10 суток формировались лишь небольшие микроколонии. В целом это исследование позволило визуализировать нативную структуру сформированной биопленки и проследить этапы ее формирования, а также деградацию. Таким образом, использование покровных стекол вполне

применимо к исследованию биопленочных организмов оз. Байкал в естественных условиях обитания.

5. Определение видового состава биопленок литоральной зоны озера Байкал по последовательностям гена *16S* рРНК

В результате амплификации и секвенирования были определены фрагменты нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК для 20 клонов. Длина полученных фрагментов составила 850 п.о. На основе девяти выделенных последовательностей было построено филогенетическое древо (рис. 8).

На филогенетическом древе видно, что анализируемые микроорганизмы распределились по восьми кластерам и объединились с бактериями, принадлежащими родам *Geobacillus*, *Bacteroidetes*, *Flavobacterium*, *Rhodobacter*, *Rubritalea*; при этом все значимые узлы имеют высокие бутстрэп-поддержки. Полученные последовательности относятся к различным филогенетическим группам: *Sphingobacteria*, *Flavobacteria*, *Bacilli*, *Verrucomicrobiae*, α -*Proteobacteria* и β -*Proteobacteria*. Следует отметить, что среди биопленочных микроорганизмов оз. Байкал присутствовали представители групп β -*Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Flavobacteria*, *Bacilli* и *Verrucomicrobiae*, отмеченные также в составе пикопланктона оз. Байкал. Было обнаружено, что 7 определенных последовательностей принадлежали к группе *Sphingobacteria*, что составило 37% от общего числа полученных последовательностей. Среди биопленочных микроорганизмов оз. Байкал не были выявлены последовательности таких групп микроорганизмов как *Planctomyces*, *Holophaga*, *Nitrospira*, δ -*Proteobacteria* и *Actinobacteria*, обнаруженных ранее в воде.

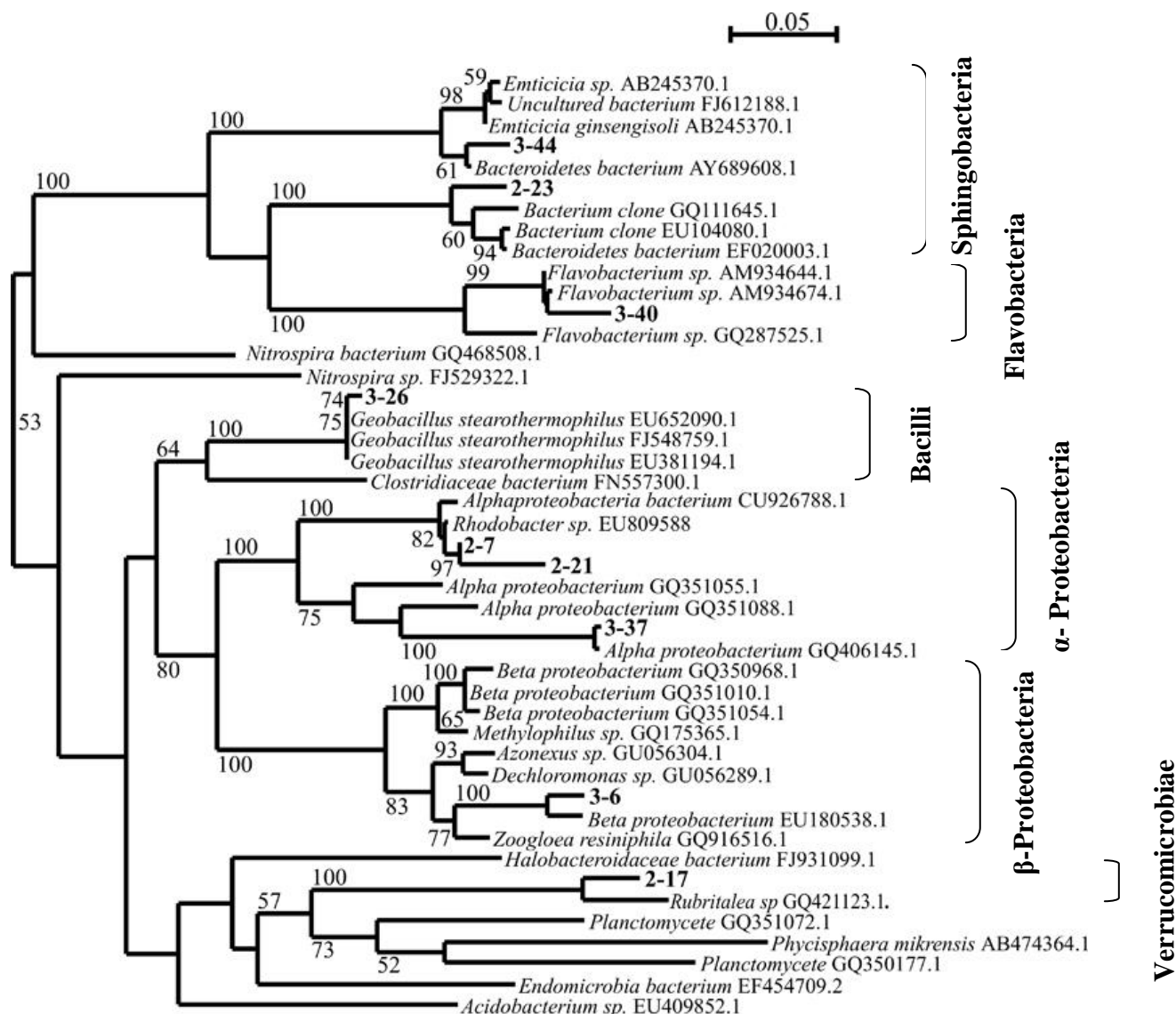


Рис. 8. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия, для некультивируемых байкальских бактерий и их ближайших родственников из банка данных. Приведены значения бутстрэпа больше 50%.

ВЫВОДЫ

1. Со стальной пластинки, гранита, мрамора и амфиболита было выделено 150 чистых культур микроорганизмов и изучены их физиологические активности. Идентифицированы пять доминирующих родов микроорганизмов, обитающих на стальной пластине, которая была погружена в литоральной зоне озера Байкал на полигоне у м. Березовый: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Alcaligenes* и *Aureobacterium*.

2. Было выяснено, что микроорганизмы биопленок растворяют соединения кремния, обладают протеолитической, фосфатазной и амилалитической активностью; тем самым они могут активно участвовать в деструкции органического материала, поступающего на дно озера, способствуя круговороту основных биогенных элементов в экосистеме Байкала.

3. При исследовании биообрастаний в лабораторных условиях было показано, что водные микроорганизмы литоральной зоны оз. Байкал были способны формировать биопленку, причем скорость образования биопленки и ее структура зависели от концентрации питательных веществ, добавленных в воду.

4. С помощью методов сканирующей, трансмиссионной и эпифлуоресцентной микроскопии было показано морфологическое разнообразие микроорганизмов, обитающих в биопленках. Определена численность основных групп микроорганизмов с камней, выстилающих литоральную зону (от 0.1 до 2747 тыс. КОЕ/см²), а также посчитана ОЧБ на 1 см² стальной пластины (420 тыс. клеток).

5. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК, клонированных из природных биопленочных образцов озера Байкал, выявил большое разнообразие микроорганизмов, входящих в состав биопленки. Среди них встречались следующие таксономические группы: сфингобактерии (7), альфа протеобактерии (3), цианобактерии (3), веррукомикробии (2), бациллы (1), гамма протеобактерии (1), флавобактерии (1) и бета протеобактерии (1).

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

Статья:

1. Парфенова В.В., Мальник В.В., Бойко С.М., Шевелева Н.Г., Логачева Н.Ф., Евстигнеева Т.Д., Сутурин А.Н., Тимошкин О.А. Сообщества гидробионтов, развивающиеся на поверхности раздела фаз: вода – горные породы в озере Байкал // Экология. 2008. №3. С. 211-216.

Главы в коллективной монографии:

2. Тимошкин О.А., Сутурин А.Н., Вада Э., Коултер Дж., Бойко С.М., Бондаренко Н.А., Евстигнеева Т.Д., Зайцева Е.П., Иванов В.Г., Кравцова Л.С., Куликова Н.Н., Логачева Н.Ф., **Мальник В.В.** и др. Насколько реалистично создание

универсальной концепции (схемы) слежения за состоянием экосистем?

Ландшафтно-экологические исследования на озере Байкал как возможная модель // VI ч., гл 1., С 705-708. В кн.: Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: В 2 томах. – Новосибирск: Наука, 2009. – Т. II: Водоемы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии, кн. 1/ О.А. Тимошкин, В.И. Провиз, Т.Я. Ситникова и др. – 980 с., [17,2л.] вкл. – (Справочники и определители по фауне и флоре озера Байкал).

3. **Мальник В.В.**, Тимошкин О.А., Бойко С.М. Предварительные сведения о качественных и количественных характеристиках микробиофлоры, ассоциированной в развитии с подводными лишайниками и корковыми губками сем. *Lubomirskiidae*, населяющими геологические породы разного типа // VI ч., гл 12., С. 888-891. В кн.: Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна: В 2 томах. – Новосибирск: Наука, 2009. – Т. II: Водоемы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии, кн. 1/ О.А. Тимошкин, В.И. Провиз, Т.Я. Ситникова и др. – 980 с., [17,2л.] вкл. – (Справочники и определители по фауне и флоре озера Байкал)

Тезисы:

4. Timoshkin O.A., Suturin A.N., Kravtsova L.S., Kulikova N.N., **Mal'nik V.V.**, Sitnikova T.Ya, Obolkina L.A., Sheveleva N.G., Rozhkova N.A. et. al. Biodiversity, productivity of shallow-water zoobenthos of Lake Baikal and the main factors, which determine them // Abstract Volume. 6 International Symposium on terrestrial environmental changes in East Eurasia and adjacent areas AASA board meeting, Irkutsk-Listvyanka, Russia, August 24-28, 2007. Book of abstracts. P. 74-75.

5. **Mal'nik V.V.**, Timoshkin O.A., Gabaev I.I., Parfenova V.V., Boiko S.M., Sheveleva N.G., Logacheva N.F., Evstigneeva T.D. and Suturin A.N. The communities of hydrocoles developing on surfaces of granite, marble and amphibolite in shallow zone

of the Lake Baikal // Abstract Volume. 6 International Symposium on terrestrial environmental changes in East Eurasia and adjacent areas AASA board meeting, Irkutsk-Listvyanka, Russia, August 24-28, 2007. Book of abstracts. P. 49.

6. **Мальник В.В.**, Габаев И.И., Парфенова В.В. Разнообразие микроорганизмов, входящих в состав биопленок оз. Байкал на основе данных молекулярного анализа // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ. Материалы 2-го Байкальского Микробиологического Симпозиума с международным участием. Иркутск, 10-15 сентября, 2007. Тезисы. С. 152-153.

7. **Мальник В.В.** Микробные сообщества, обитающие на границе раздела фаз вода – твердое тело // Биоразнообразие Экосистем Внутренней Азии. Тезисы Всероссийской конференции с международным участием. Улан-Удэ, 5-10 сентября, 2006. Тезисы. С. 60.

8. **Мальник В.В.** Микроорганизмы, заселяющие субстраты из горных пород на границе вода – донные осадки оз. Байкал // Научное Творчество Молодежи. Материалы X Всероссийской научно-практической конференции. Издательство Томского университета, 21-22 апреля, 2006. Тезисы. С. 53.

9. Парфенова В.В., Павлова О.Н., Белькова Н.Л., Теркина И.А., Сулова М.Ю., **Мальник В.В.** Биоразнообразие и функциональная активность микробного сообщества оз. Байкал // IX Съезд Гидробиологического общества РАН. Тезисы докладов. Тольятти, 18-22 сентября, 2006. Тезисы. Т. 2. С. 83.

10. **Мальник В.В.**, Парфенова В.В. Агрегированные сообщества микроорганизмов в водной толще озера Байкал // Четвертая Верещагинская Байкальская Конференция. Тезисы докладов и стендовых сообщений. Иркутск, 26 сентября – 1 октября, 2005. Тезисы. С. 120-121.

11. Тимошкин О.А., Сутурин А.Н., Кравцова Л.С., Куликова Н.Н., **Мальник В.В.**, Парфенова В.В. и др. Краткие результаты междисциплинарных исследований, проведенных на полигоне Березовый (Южный Байкал) за период 2000 – 2007 гг. с акцентом на разнообразие, продуктивность бентоса мелководной зоны озера и основные факторы их определяющие // Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле. Доклады Научно-Практической Конференции. П. Листвянка

Иркутской области, 18-20 марта, 2008. Новосибирск. Издательство СО РАН. С. 344-357.