

Характеристика сообществ микроорганизмов из оз. Байкал, развивающихся на стальной пластине и в природной воде, окружающей данный субстрат

В. В. МАЛЬНИК¹, В. В. ПАРФЕНОВА¹, А. Н. СУТУРИН¹, О. А. ТИМОШКИН¹, Н. С. ПАВЛОВСКАЯ²

¹ Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
E-mail: malnik80@mail.ru

² Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132

Статья поступила 22.10.2012

АННОТАЦИЯ

Представлен анализ микробного сообщества, развивающегося на пластине из нержавеющей стали. Сделан анализ пробы по гену *groC* с этой пластинки. Идентификация доминирующих видов (клонов) биопленки проведена с использованием молекулярного клонирования и определения нуклеотидной последовательности участка гена *16S* рРНК. Представлено сравнение активностей микроорганизмов, ведущих планктонный образ жизни и прикрепленных в биопленке. Обнаружено, что 7 из 19 секвенированных последовательностей (37 %) принадлежали к группе *Sphingobacteria*. Анализ нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК, клонированных из природных биопленочных образцов оз. Байкал, выявил широкое разнообразие микроорганизмов, входящих в состав биопленки. Среди них отмечены следующие таксономические группы: сфингобактерии, α -протеобактерии, цианобактерии, веррукомикробии, бациллы, γ -протеобактерии, флавобактерии и β -протеобактерии. Подобный анализ проведен для оз. Байкал впервые.

Ключевые слова: биопленка, оз. Байкал, микроорганизмы, *16S* рРНК, рНК-полимераза, ген *groC*, клонирование.

Известно, что доля культивируемых гетеротрофных бактерий в оз. Байкал составляет всего 0,01–0,20 % [Лаптева, 1990], поэтому классических методов микробиологии недостаточно для оценки биоразнообразия микроорганизмов, развивающихся в планктоне и в биопленках. Гораздо более информативны методы молекулярной биологии.

Состав микробных сообществ пелагиали оз. Байкал с помощью методов классической микробиологии изучен достаточно хорошо. Характеристика физиологических групп планк-

тонных микроорганизмов и их общей численности в различных районах озера приведена во многих публикациях [Максимов и др., 1984; Гоман и др., 1986; Максимова, Максимов, 1989].

Первые данные по молекулярно-биологическим исследованиям планктонных организмов оз. Байкал были опубликованы в 1996 г. Исследователи, изучающие микроорганизмы, обитающие в воде оз. Байкал, отмечают наличие группы α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria, δ -Proteobacteria,

Cyanobacteria, Actinobacteria, Planctomyces, Holophaga и Nitrospira. При этом отмечается, что микроорганизмы, обитающие в водной толще озера, представлены в основном циано-, протео- и актинобактериями [Белькова и др., 1996].

По данным Е. А. Семеновой [1998], изучавшей пикопланктон оз. Байкал, все выделенные последовательности входили в состав следующих групп: Cyanobacteria, Actinobacteria, Flavobacteria, Planctomyces, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, β -Proteobacteria, Verrucomicrobia и Clostridium. Представители гетеротрофного планктона входили в состав шести таксономических групп и по количеству обнаруженных типов рДНК (15 из 22) в два раза превышали автотрофный пикопланктон, при этом наибольшее количество гетеротрофов (5) относилось к β -Proteobacteria.

До начала настоящих исследований литературных данных по составу (биоразнообразию) микроорганизмов биопленок оз. Байкал не существовало. Первые данные по микробиоте и предпочтительности заселения на разных геологических субстратах представлены в работе В. В. Парфеновой с соавт. [2008].

В 2011 г. опубликован материал о разнообразии биопленок в оз. Байкал, развивающихся на различных геологических субстратах [Гладких и др., 2011].

Молекулярно-биологический подход к изучению планктонной микрофлоры в настоящее время применяется широко [Fuhrman et al., 1988; Selje, Simon, 2003; Pontes et al., 2007].

В отличие от морских экосистем исследования микроорганизмов биопленок в озерных и речных экосистемах весьма немногочисленны [Rickard et al., 2002; Rickard et al., 2003].

В рамках этой темы проведены исследования на пластинках из горных пород, типичных для литорали оз. Байкал, и выявлена предпочтительность заселения их микроорганизмами [Парфенова и др., 2008]. В продолжение этих исследований рассмотрено развитие микроорганизмов на инертном субстрате, исключая влияние геологической составляющей (стальной пластине), и показано их разнообразие с помощью молекулярного подхода. Работы, выполненные с

помощью этих подходов за рубежом, встречаются редко [Kolari et al., 1998; Acuna et al., 2006]. По нашему мнению, стальные пластинки являются оптимальным субстратом для изучения биопленок *in vivo*.

Изучением различного рода биопленок занимаются многие иностранные и российские ученые: М. Е. Davey, G. O'Toole [2000], P. Stoodley, D. G. Davies, J. W. Costerton [2002], Ю. М. Романова и др. [2006].

Цель настоящей работы – выявление физиологических групп микроорганизмов и выполнение молекулярно-генетической идентификации микроорганизмов из планктона и биопленки, а также изучение таксономического разнообразия микроорганизмов из сообщества биопленок литоральной зоны оз. Байкал.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2009 г. Пробы брали с пластинок из нержавеющей стали, которые были погружены в заливе Большие Коты на глубину 1 м на расстоянии около 30 м от берега. Площадь стальной пластинки составляла 35 см². Эксперимент длился 4 мес. При снятии пластинка помещалась в стерильный полиэтиленовый пакет с застежкой, в который набиралась окружающая пластинку вода. Исследованы три пластинки с окружающей их водой, отобранные в один день.

Методы классической микробиологии. С металлической пластинки снимали биопленку (2 см²) и суспензировали в 10 мл байкальской стерильной воды с приготовлением впоследствии десятикратных разведений до третьего порядка.

Посев проводили из первого и третьего разведения с биопленки и параллельно с образцом воды, взятого в месте ее экспонирования. Количественный и качественный анализ проводили на наличие нитрификаторов, денитрификаторов, целлюлолитиков, обладателей щелочной фосфатазы, амилोलитиков, протеолитиков, фосфатрастворяющих и силикатрастворяющих бактерий.

Выделение геномной ДНК. ДНК выделяли из микроорганизмов, обитающих на стальной пластинке.

Для выделения суммарной ДНК применяли два метода:

1) с использованием насыщенного фенола и хлороформа:

Брали 1 мл ТЕ-буфера (*tris*-HCl, pH 8,0; ЭДТА) и растворяли в нем лизоцим. Биопленки с пластинок ресуспендировали в ТЕ-буфере. К полученной взвеси добавляли 0,01 г поливинилпирролидона (ПВП), растирали в ступке и разливали в четыре пробирки по 1 мл. В каждую из четырех пробирок добавляли по 250 мкл лизоцима и перемещали их в термостат (37 °С, 1 ч), встряхивая каждые 15 мин. Затем их переставляли на водяную баню (50–58 °С, 10 мин), после чего замораживали на 20 мин. Повторяли три таких цикла, причем конечный продукт должен быть оттаян. Центрифугировали пробирки для отделения твердой и жидкой фазы, последнюю распределяли по двум новым пробиркам. В каждую из пластиковых пробирок добавляли ПВП для адсорбции гуминовых веществ, закрывали их, перемешивали и оставляли на несколько минут. Далее в каждую из восьми пробирок добавляли по 500 мкл насыщенного фенола (pH 8,0) и оставляли их на 10 мин, периодически перемешивая. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин, осторожно отбирали верхний слой жидкости и разливали его в восемь пробирок по 500 мкл. В каждую пробирку добавляли равный объем хлороформа, встряхивали и оставляли их на 10 мин, периодически взбалтывая. Далее снова пробы центрифугировали 15 мин, осторожно отбирали верхний слой и к нему добавляли два объема 96%-го этилового спирта, ацетат натрия (pH 5,5) – 1/10 часть всего объема (35 мкл) и гликоген (5 мкл), в результате чего общий объем смеси получался 1,5 мл. Каждую пробирку перемешивали и оставляли при –20 °С на 12 ч. Затем пробы центрифугировали 30 мин, после чего сливали 96%-й этиловый спирт, а к ДНК добавляли по 100 мкл 70%-го этилового спирта и центрифугировали два раза по 10 мин. Спирт аккуратно отбирали, а пластиковые пробирки переворачивали и высушивали ДНК в течение 30 мин. Затем ДНК растворяли в 20 мкл воды, собирали ее в две пластиковые пробирки и переносили в среду с температурой –20 °С до амплификации [Шубенкова и др., 2005].

2) модифицированный цетавлоновый (цетавлон-бромистый гексадецилтриметиламоний) метод:

Пробы центрифугировали, добавляли в них лизирующий буфер и растирали пестиком при 60 °С около 30 мин. Затем к 500 мкл пробы в лизирующем буфере добавляли 140 мкл лизоцима (конц. = 15 мг/мл), ставили на 40 мин в термостат при 37 °С, центрифугировали, отбирали водную фазу с ДНК и разливали в две пластиковые пробирки по 200 мкл. После этого добавляли по 1 мл 1%-го цетавлонового буфера (СТАВ-буфера) в каждую пробирку, замораживали их в морозильной камере, а затем оттаивали и центрифугировали в течение 20 мин. На следующем этапе отбирали водную фазу, промывали осадки этим же буфером (по 800 мкл) и центрифугировали в течение 5 мин. Далее отбирали СТАВ-буфер и в каждую пробирку добавляли по 400 мкл 96%-го этилового спирта. Из одной пробирки, заранее встряхнув осадок, содержимое переносили в другую пробирку и оставляли ее в термостате при 60 °С в течение 10 мин, для того чтобы ДНК перешла в спирт. Пипетированием разрушали осадок, центрифугировали, отбирали спирт, в котором содержалась ДНК, и помещали его в отдельную пластиковую пробирку. Добавляли в спирт 3М ацетат натрия (pH 5,2) – 1/10 от объема ДНК в растворе + + 2 объема этилового спирта и оставляли при –20 °С на 12 ч. Спирт с ДНК центрифугировали в течение 30 мин. К оставшейся ДНК добавляли 150 мкл 80%-го этилового спирта и центрифугировали ее в течение 10 мин. Затем спирт отбирали, а ДНК высушивали при 37 °С в термостате, после чего ДНК растворяли в однократном ТЕ-буфере [Грачев и др., 2006].

Амплификация фрагментов гена 16S рРНК. В данном исследовании для амплификации использовали универсальные праймеры на консервативные участки гена 1350R (5'-CACGGGCGGTGTGTACAAG-3') и 500L (5'-GTGCCAGCAGCCGCGGТАА-3'). На паре плазмидных праймеров проводили амплификацию фрагментов гена 16S рРНК после трансформации. Они имеют следующие названия и структуру: pJET1.2 forward sequencing primer 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3' и pJET1.2 reverse sequencing primer

5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'. Также в работе использовались универсальные плазмидные праймеры M13-UP 5'-GGAAACAGSTATGACCAT-3' и M13-DOWN 5'-GTA AACGACGGCCAGTG-3'.

ПЦР проводили в амплификаторе БИС Модель 111 фирмы ООО "БИС-Н" (Россия) с использованием реагентов фирмы "Амплиценс" (Россия) в 15 мкл реакционной смеси, содержащей буфер – 1,5 мкл, 25 mM MgCl₂ – 1,5 мкл, 10 mM дНТФ – 0,3 мкл, 500L – 0,15 мкл, 1350R – 0,15 мкл, Taq Pol – 0,15 мкл, H₂O – 10,25 мкл, ДНК – 1 мкл, в течение 35 циклов в следующем режиме: денатурация (94 °C, 60 с), отжиг (48–54 °C, 60 с) и элонгация (72 °C, 70 с). Продукты ПЦР анализировали электрофорезом в 1%-м агарозном геле, фрагменты ДНК ожидаемой длины экстрагировали и концентрировали из агарозного геля с помощью набора DNA and Gel Band Purification kit ("Amersham Biosciences", США) по методике, рекомендованной производителем.

Амплификация фрагмента гена *groS*. Амплификацию фрагмента гена *groS*, кодирующего β-субъединицу РНК-полимеразы прокариот, проводили с праймерами F150 и R650, структуру которых выбирали на основе последовательностей гена *groS* микроорганизмов, доступных в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Молекулярное клонирование. В работе использовали наборы для клонирования: InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (набор 1) и CloneJET™ PCR Cloning Kit (набор 2). Продукты амплификации ДНК клонировали с использованием векторов pTZ57R/T и pJET1.2/blunt Cloning Vector ("Fermentas", США). Используемый в работе набор CloneJET™ PCR Cloning Kit предназначен для лигирования продуктов с тупыми концами. ПЦР-продукты с тупыми концами, полученными с помощью корректирующих ДНК-полимераз, могут быть сразу же лигированы с вектором для клонирования pJET/blunt. ПЦР-продукты с липкими концами, полученные с помощью Taq ДНК-полимеразы или другими термостабильными ДНК-полимеразами, затупляются с помощью высокоэффективного термостабильного фермента ДНК-blunting (термостабильный фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*) перед лигированием. В работе

использовали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α ("Biorad", Германия). Для определения титра жизнеспособных клеток использовали колориметр КФК-2-УХЛ 4.2 (Россия). Бактерии выращивали при температуре 37 °C до оптической плотности 0,5 (длина волны 590 нм, кювета 1 см). Трансформацию проводили согласно описанному ранее методу [Sambrook et al., 1989]. Для "оживления" клеток непосредственно после трансформации суспензию инкубировали 60 мин при 37 °C в питательной среде SOC.

После трансформации бактерии высевали на чашки Петри с твердой средой Луриа–Бертани (LB-среда), содержащей 20 мкг/мл ампициллина и 0,0005 % X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид) для проведения бело-голубого скрининга. В случае использования вектора pJET/blunt клетки высевали на чашки Петри со средой LB, содержащей 20 мкг/мл ампициллина. Чашки в обоих случаях инкубировали ночь при 37 °C.

Плазмидную ДНК для анализа выделяли кипячением отобранных колоний в 40 мкл TE-буфера в течение 5 мин. Клоны, содержащие вставки ожидаемого размера, выявляли с помощью ПЦР-анализа с использованием универсальных плазмидных праймеров в случае применения набора 1 и с использованием праймеров pJET 1.2 forward и pJET 1.2 reverse в случае применения набора 2.

Определение и анализ полученных последовательностей. Нуклеотидные последовательности определяли с помощью автоматического секвенатора SEQ 8800 ("Beckman Coulter", США).

Для сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей с известными в GenBank использовали пакет программ BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *16S* рРНК выравнивали с помощью ClustalW [Thompson et al., 1994] и оптимизировали вручную, используя программу BioEdit [Hall, 1999].

Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) [Felsenstein, 1981] с помощью программы Phym1 [Bevan et al., 2005]. Достоверность топологии древа оценивали с помощью непараметрического бутстрэпа. Для

оценки генетических дистанций использовали модель нуклеотидных замен НКУ [Nasegawa et al., 1985]. Модель замен выбирали согласно jModelTest [Posada, 2008].

Филогенетический анализ. Филогенетический анализ проводили для уточнения систематического положения исследуемых микроорганизмов. Кроме набора нуклеотидных последовательностей, полученных в ходе исследований, для филогении использовали гомологичные последовательности, извлеченные из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Провели сравнение активностей микроорганизмов, ведущих планктонный образ жизни и прикрепленных к субстрату. Анализ результатов показал, что в составе биопленки выявлены все исследованные физиологические группы микроорганизмов. Они присутствуют и в планктоне, но в очень малом количестве. Выявлено, что как в биопленочных, так и в планктонных пробах преобладающими были сапрофитные и амилолитические

микроорганизмы. В обоих случаях значительная часть выявленных микроорганизмов относилась к олиготрофам. Полученные результаты представлены на рис. 1.

В результате амплификации и секвенирования были определены фрагменты нуклеотидных последовательностей гена *16S* рРНК для 19 клонов. Длина полученных фрагментов составила 850 п. н. Часть этих последовательностей зарегистрирована в международном EMBL-банке данных номерами HM042440-HM042449.

На основе девяти выделенных последовательностей построено филогенетическое древо (рис. 2), из которого следует, 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, Firmicutes, Verrucomicrobia, α -Proteobacteria и β -Proteobacteria. Среди полученных последовательностей

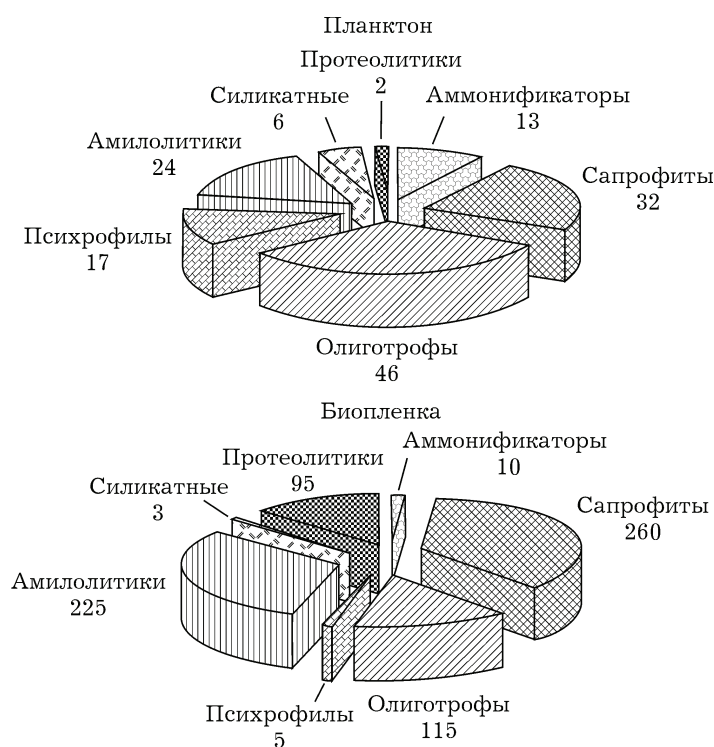


Рис. 1. Соотношение различных групп микроорганизмов в планктоне (KOE/мл) и биопленке (KOE 10²/см²)

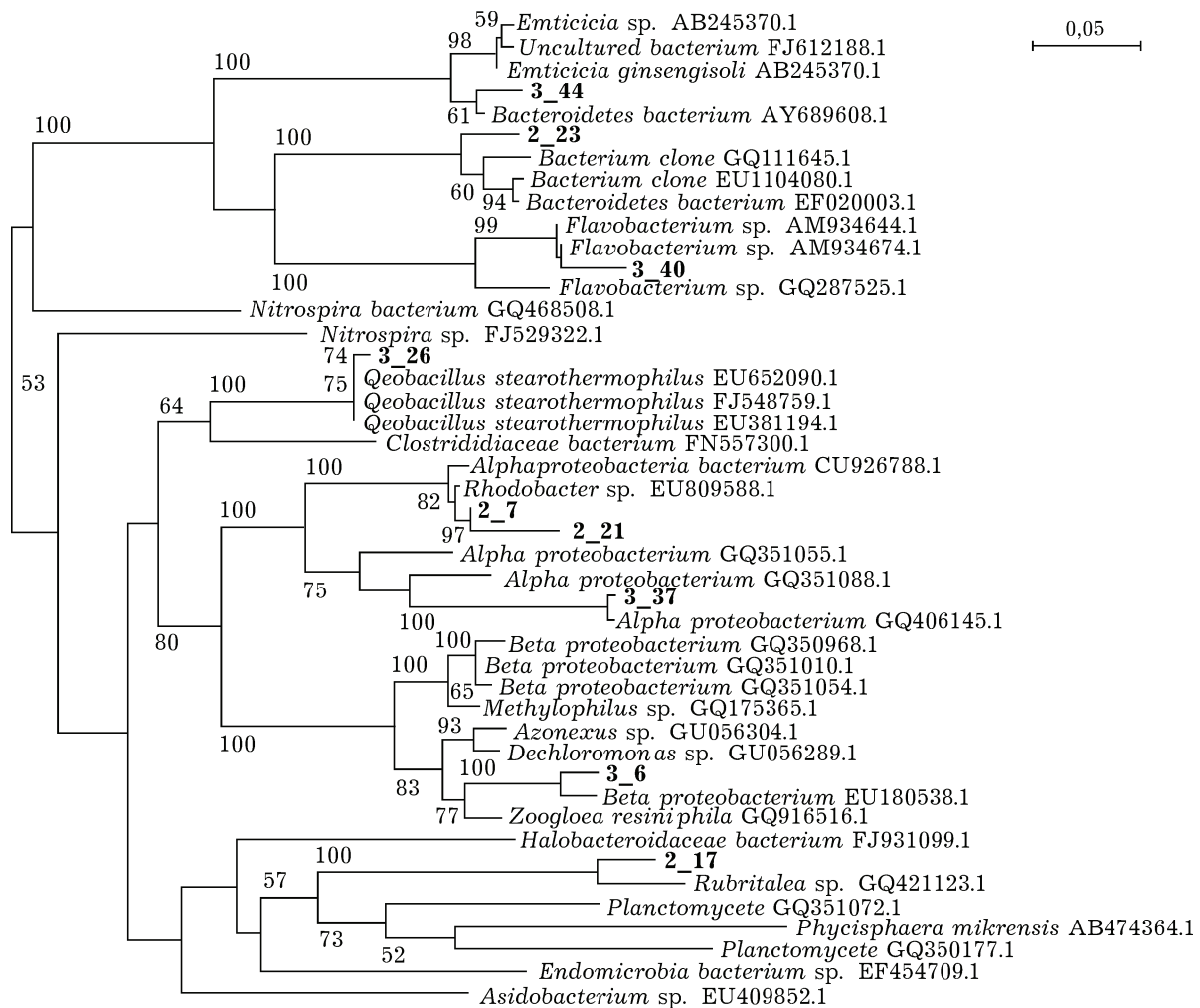


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия, для байкальских бактерий и их ближайших родственников из GenBank. Размер выравненных последовательностей составил 850 п. н. Приведены значения бутстрэпа больше 50 %

встречены следующие таксономические группы микроорганизмов: сфингобактерии (7)*, α -протеобактерии (3), цианобактерии (3), веррукомикробии (2), бациллы (1), γ -протеобактерии (1), флавобактерии (1) и β -протеобактерии (1).

Кроме того, среди биопленочных микроорганизмов оз. Байкал нами обнаружены представители групп β -Proteobacteria, Cyanobacteria, Flavobacteria, Firmicutes и Verrucomicrobia, выявленные прежде в составе пикопланктона оз. Байкал [Белькова и др., 1996; Семенова, Кузнецов, 1998]. Выявлено, что 7 определенных последовательностей

*В скобках указано количество нуклеотидных последовательностей той или иной группы микроорганизмов, определенных нами на секвенаторе.

принадлежали к группе Sphingobacteria, что составило 37 % от общего числа полученных. Среди биопленочных микроорганизмов оз. Байкал не обнаружены последовательности таких групп микроорганизмов, как Planctomyces, Holophaga, Nitrospira, δ -Proteobacteria и Actinobacteria, обнаруженных ранее в воде.

Все полученные при секвенировании последовательности гена 16S рРНК имели гомологию с последовательностями в GenBank от 87 до 99 %.

В результате амплификации и секвенирования определены фрагменты нуклеотидных последовательностей гена *groC* для 10 клонов. Длина полученных фрагментов составила 520 п. н. Заметим, что последовательнос-

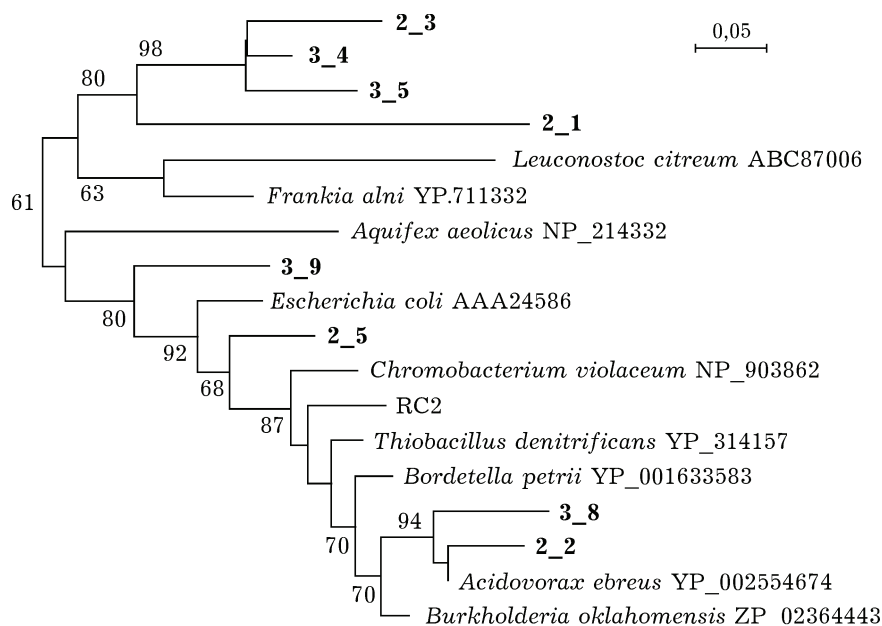


Рис. 3. Филогенетическое древо, построенное методом максимального правдоподобия, для байкальских бактерий и их ближайших родственников из GenBank. Последовательности *rpoC*, полученные в данной работе, выделены жирным шрифтом (за исключением RC2), остальные взяты из банков данных. Приведены значения бутстрэпа больше 60 %

ти всех проанализированных клонов имели отличающиеся структуры.

Последовательность **3_9** показала 86%-ю гомологию с последовательностью вида *Sphingopyxis alaskensis* (α -Proteobacteria), последовательность **2_5** показала 90%-ю гомологию с последовательностью вида *Xanthomonas campestris* (γ -Proteobacteria). Последовательности **2_2** и **3_8** имели 84%-е и 88%-е сходство с последовательностью гена *rpoC* видов *Polaromonas* sp. и *Acidovorax* sp. (β -Proteobacteria) соответственно. Последовательности RC2 и **2_1** показали 80%-ю гомологию с видами *Thiobacillus denitrificans* (β -Proteobacteria) и *Cythofaga hutchinsoni* (Sphingobacteria) соответственно. Из десяти проанализированных последовательностей четыре клона имели низкую степень сходства (меньше 75 %) при сравнении с гомологичными последовательностями из банка данных.

На основе восьми выделенных последовательностей построено филогенетическое древо (рис. 3).

Предпринятая попытка анализа разнообразия биопленочных микроорганизмов литоральной зоны оз. Байкал с помощью гена *rpoC* позволила сделать некоторые выводы. Сте-

пень гомологии полученных нами последовательностей с последовательностями из GenBank оказалась достаточно низкой (74–90 %), что может быть связано с эндемичностью микроорганизмов, обитающих в оз. Байкал, а также с малым количеством последовательностей гена *rpoC* в базах данных. Амплификация и клонирование фрагмента гена *rpoC* из суммарной ДНК не вызывали особых проблем. По-видимому, используемые для амплификации фрагмента *rpoC*-гена праймеры достаточно универсальны, так как с их помощью удалось получить достаточно широкий набор различающихся структур. При сравнении полученных *rpoC* последовательностей с гомологичными структурами из банка данных степень сходства последовательностей не превышала 90 %. Это не позволило определить родовую принадлежность исследованных клонов. Следовательно, хотя разрешающая способность последовательностей гена *rpoC* выше по сравнению с геном *16S* рРНК, использование гена *rpoC* как маркера для изучения структуры биопленочного сообщества оз. Байкал в настоящее время затруднено малочисленностью сведений по гену *rpoC* для близкородственных микроор-

ганизмов. В дальнейшем эта задача может быть решена при определении последовательностей *rpoC*-гена у чистых культур байкальских микроорганизмов, а также при расширении банка данных по последовательностям этого гена у микробов из разных экосистем, чему в данное время способствуют темпы по освоению полногеномного секвенирования у микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке госбюджетных проектов № VI.51.1.9 “Особенности формирования и жизненная стратегия микробного сообщества и вирусов в биопленках в оз. Байкал”, № VII.62.1.4 “Междисциплинарное исследование заплесковой зоны как важной составляющей литорали оз. Байкал”, интеграционных проектов № 49 и № 96, гранта РФФИ № 10-05-01078-а.

ЛИТЕРАТУРА

- Белькова Н. Л., Денисова Л. Я., Манакова Е. Н., Зайчиков Е. Ф., Грачев М. А. Видовое разнообразие глубоководных микроорганизмов озера Байкал, выявленное по последовательностям 16S рРНК // Докл. РАН. 1996. Т. 348, № 5. С. 692–695.
- Гладких А. С., Бельх О. И., Левина О. В., Парфенова В. В. Метагеномный анализ сообществ микроорганизмов из оз. Байкал // Вестн. Уральской мед. акад. науки. 2011. № 4/1. С. 76–77.
- Гоман Г. А., Дрюккер В. В., Федорова О. В., Афанасьев В. А. Сезонная динамика и пространственное распределение физиологических групп микроорганизмов в Байкале. Структура и функционирование сообществ водных микроорганизмов. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1986. 247 с.
- Грачев М. А., Кузнецова С. Ю., Щербакова Т. А. Метод выделения высокоочищенной ДНК для использования в полимеразной цепной реакции // Молекуляр. биология. 2006. Т. 40, № 1. С. 180–183.
- Лаптева Н. А. Видовая характеристика гетеротрофных бактерий в озере Байкал // Микробиология. 1990. Т. 59. С. 499–506.
- Максимов В. Н., Максимова Э. А., Рудых А. Р. Микробиологическая характеристика водных масс в районах впадения крупных рек Северного Байкала // Вод. ресурсы. 1984. № 3. С. 125–130.
- Максимова Э. А., Максимов В. Н. Микробиология вод Байкала. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1989. 168 с.
- 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 оз. Байкал // Экология. 2008. № 3. С. 211–216.
- Романова Ю. М., Смирнова Т. А., Андреев А. Л., Ильина Т. С., Диденко Л. В., Гинцбург А. Л. Образование биопленок – пример социального поведения бактерий // Микробиология. 2006. Т. 75, № 4. С. 556–561.
- Семенова Е. А., Кузнецов К. Д. Изучение видового разнообразия пикопланктона озера Байкал путем сравнительного анализа 5′-концевых участков генов 16S рРНК // Молекуляр. биология. 1998. Т. 32, № 6. С. 895–901.
- Шубенкова О. В., Земская Т. И., Черницина С. М., Хлыстов О. М., Трибой Т. И. Первые результаты исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов осадков Южного Байкала в районе приповерхностного залегания гидратов метана // Микробиология. 2005. Т. 74, № 3. С. 370–377.
- Acuna N., Ortega-Morales B. O., Valadez-Gonzalez A. Biofilm colonization dynamics and its influence on the corrosion resistance of austenitic UNS S31603 stainless steel exposed to Gulf of Mexico seawater // Mar. Biotechnol. 2006. Vol. 8, N 1. P. 62–70.
- Bevan R. B., Lang B. F., Bryant D. Calculating the evolutionary rates of different genes: a fast, accurate estimator with applications to maximum likelihood phylogenetic analysis // Systematic Biology. 2005. Vol. 54, N 6. P. 900–915.
- Davey M. E., O’Toole G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64, N 4. P. 847–867.
- Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach // J. Mol. Evol. 1981. Vol. 17. P. 368–376.
- Fuhrman J. A., Comeau D. E., Hagstrom A., Chan A. M. Extraction from natural planktonic microorganisms of DNA suitable for molecular biological studies // Appl. Environ. Microbiol. 1988. Vol. 54, N 6. P. 1426–1429.
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. Vol. 41. P. 95–98.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // J. Mol. Evol. 1985. Vol. 22. P. 160–174.
- Kolari M., Mattila K., Mikkola R., Salkinja-Salonen M. S. Community structure of biofilms on ennobled stainless steel in Baltic Sea water // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 21. P. 261–274.
- Pontes D. S., Lima-Bittencourt C. I., Chartone-Souza E., Amaral Nascimento A.M. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity // Ibid. 2007. Vol. 34, N 7. P. 463–473.
- Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging // Mol. Biol. and Evolution. 2008. Vol. 25. P. 1253–1256.
- Rickard A. H., Leach S. A., Hall L. S., Buswell C. M., High N. J., Handley P. S. Phylogenetic relationships and coaggregation ability of freshwater biofilm bacteria // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68, N 7. P. 3644–3650.
- Rickard A. H., McBain A. J., Ledder R. G., Handley P. S., Gilbert P. Coaggregation between freshwater bacteria within biofilm and planktonic communities // FEMS Microbiol. Lett. 2003. P. 133–140.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Vol. 1, 2, 3.
- Selje N., Simon M. Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the

Weser estuary, Germany // *Aquat. Microb. Ecol.* 2003. Vol. 30. P. 221–237.
Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., Costerton J. W. Biofilms as complex differentiated communities // *Ann. Rev. Microbiol.* 2002. Vol. 56. P. 187–209.

Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice // *Nucl. Acids Res.* 1994. Vol. 22. P. 4673–4680.

Characterization of the Communities of Microorganisms from Lake Baikal Developing on a Steel Plate and in Natural Water Surrounding This Substrate

V. V. MALNIK¹, V. V. PARFENOVA¹, A. N. SUTURIN¹, O. A. TIMOSHKIN¹,
N. S. PAVLOVSKAYA²

¹ *Limnological Institute, SB RAS*
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3
E-mail: malnik80@mail.ru

² *Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, SB RAS*
664033, Irkutsk, Lermontov str., 132

Analysis of the microbial community developing on a plate made of stainless steel is presented. The sample was analyzed for the *rpoC* gene from this plate. Identification of dominant species (clones) of the biofilm was performed using molecular cloning and determination of the nucleotide sequence of the region of *16S* rRNA gene. A comparison between the activities of the microorganisms of the plankton way of life and those adherent in the biofilm is presented. It was discovered that 7 of 19 treated sequences (37 %) belonged to the Sphingobacteria group. Analysis of nucleotide sequences of the *16S* rRNA gene, cloned from natural biofilm samples from Lake Baikal, revealed a broad variety of microorganisms incorporated in the biofilm. The following taxonomic groups were revealed among them: sphingobacteria, α -proteobacteria, cyanobacteria, verrucomicrobia, bacilli, γ -proteobacteria, flavobacteria and β -proteobacteria. The analysis of this kind has been performed for Lake Baikal for the first time.

Key words: biofilm, Lake Baikal, microorganisms, *16S* rRNA, RNA-polymerase, *rpoC* gene, cloning.