

На правах рукописи

**ШТЫКОВА Юлия Рафиковна**

**СИМБИОНТНАЯ И АССОЦИИРОВАННАЯ МИКРОФЛОРА  
КИШЕЧНИКА БАЙКАЛЬСКИХ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ**

03.02.08 – экология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Иркутск, 2013

Работа выполнена в отделе микробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения Российской академии наук Лимнологического института Сибирского отделения РАН, г. Иркутск

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент,  
**Парфенова Валентина Владимировна**

Научный консультант: доктор биологических наук,  
**Ситникова Татьяна Яковлевна**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор,  
**Чхенкели Вера Александровна**

доктор медицинских наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ,  
**Савилов Евгений Дмитриевич**

Ведущая организация: Институт водных и экологических проблем ДВО РАН

Защита диссертации состоится 28 марта 2013 г. в 11.30 на заседании диссертационного совета Д 212.074.07 при ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет» по адресу: 666003, г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5, ауд. 219.

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

Отзывы просим направлять ученому секретарю диссертационного совета по адресу: 664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 1, биолого-почвенный факультет ИГУ. Тел. / факс: (3952) 241855; e-mail: dissovet07@gmail.com.  
Автореферат разослан \_\_ февраля 2013 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук,  
доцент



А. А. Приставка

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Симбиотические взаимоотношения микроорганизмов с флорой и фауной представляют особый научный интерес. В настоящее время известно, что симбиотическое взаимодействие является одной из основных форм существования микроорганизмов (Лобакова, 2006). Изучение взаимосвязи гидробионтов и микроорганизмов, населяющих их кишечный тракт, актуально в общебиологическом плане, поскольку связано с определением механизмов симбиоза, комменсализма и паразитизма, что, в свою очередь, позволяет прогнозировать особенности их существования и функционирования в изменяющихся условиях внешней среды. Важны эти исследования и в прикладном аспекте, так как позволяют определить взаимоотношения между бактериями и гидробионтами в биоценозах, а также выявить механизмы адаптации бактерий к существованию во внутренней среде водных животных и неблагоприятным условиям внешней среды.

В последние годы становится актуальным изучение таксономического разнообразия и биологической активности кишечной микрофлоры водных моллюсков, в связи с разведением их в аквакультуре, а также поиск потенциальных микроорганизмов, продуцирующих биологически активные метаболиты.

Исследования бактериальной микрофлоры кишечного тракта моллюсков начались в 60-е годы прошлого столетия. Объектами исследований являлись большей частью морские двустворчатые моллюски (Rosenberg, Breiter, 1969; Pujalte *et al.*, 1999; Беленева и др., 2007; Romanenko *et al.*, 2008).

Микрофлора кишечного тракта пресноводных брюхоногих моллюсков практически не изучена. Существуют единичные сведения о количестве и распределении некоторых групп бактерий в их пищеварительном тракте, а также о способности моллюсков накапливать в своем кишечнике микроорганизмы, часть из которых является возбудителями заболеваний животных и человека (Charrier, 1990; Syvokiene, Mickeniene, 2002; Marsollier *et al.*, 2004). Микрофлора байкальских эндемичных моллюсков единично исследована в 40-х годах XX века только в связи с выяснением роли микроорганизмов в питании бентосных беспозвоночных животных (Родина, 1954).

Биоразнообразие, численность и ферментативная активность бактериальной микрофлоры кишечника брюхоногих моллюсков оз. Байкал ранее не была исследована.

**Цель исследования** – изучить таксономический состав, количественные характеристики и ферментативную активность микробных сообществ, ассоциированных с кишечником байкальских брюхоногих моллюсков, и определить участие бактерий в жизнедеятельности моллюсков.

### **Задачи исследования:**

1. Выявить таксономический состав бактерий, ассоциированных с кишечником двух видов литоральных брюхоногих моллюсков оз. Байкал, один из которых – байкальский эндемик (*Benedictia baicalensis*), второй – широко распространенный палеаркт (*Lymnaea auricularia*).
2. Определить сезонную динамику численности бактерий в кишечнике моллюсков и выявить связь с бактериальной микрофлорой их среды обитания.
3. Сформировать коллекцию чистых культур бактерий, выделенных из пищеварительного тракта исследуемых моллюсков, определить их таксономический состав и ферментативную активность.
4. Выяснить зависимость присутствия бактерий-спирохет в кишечнике моллюсков от места обитания, механизмов питания, диеты и сезонов года. С помощью электронной микроскопии изучить морфологию клеток бактерий семейства Spirochaetaceae из кристаллического стебелька байкальских брюхоногих моллюсков.

**Научная новизна.** Впервые определены численность и разнообразие бактерий, заселяющих пищеварительный тракт байкальских беспозвоночных организмов, где обнаружены бактерии кишечной группы. Исследована ферментативная активность выделенных штаммов, являющаяся одним из показателей участия бактерий в жизнедеятельности моллюсков. Впервые в кристаллическом стебельке у 11 видов эндемичных байкальских и 3 видов переднежаберных моллюсков из Каспийского моря, а также водоемов Дальнего Востока и Северной Америки обнаружены бактерии семейства Spirochaetaceae. Впервые с помощью трансмиссионной электронной и сканирующей электронной микроскопии изучена морфология клеток байкальских спирохет. Показано, что обнаруженные спирохеты принадлежат роду *Cristispira*, и, возможно, являются новым для науки видом.

**Практическая значимость.** Сформирована коллекция культур бактерий, изолированных из различных отделов пищеварительного тракта байкальских брюхоногих моллюсков *Benedictia baicalensis* и палеарктических *Lymnaea auricularia*. Многие штаммы коллекции продуцируют пищеварительные ферменты, поэтому могут быть использованы в разработке ферментных биопрепаратов. В состав семейств Enterobacteriaceae и Spirochaetaceae, представители которых найдены в кишечнике и кристаллическом стебельке моллюсков, входят патогенные для человека, животных и растений роды, и санитарно-показательные бактерии. Полученные сведения об этих бактериях могут быть использованы в эпидемиологических исследованиях и разработке препаратов для лечения и профилактики вызываемых ими заболеваний. Полученные данные о сосуществовании ассоциированных с кишечником моллюсков бактерий можно использовать в качестве модели для изучения возможных механизмов выживания и адаптации бактерий в экосистеме озера Байкал.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Кишечник 2-х видов брюхоногих моллюсков оз. Байкал включает транзиторную и резидентную микрофлору. Транзиторная микрофлора состоит из бактерий, населяющих грунты литорали озера. Резидентная микрофлора представлена бактериями, не найденными в среде обитания или присутствующими в малом количестве.
2. Количественные характеристики микрофлоры кишечника моллюсков имеют сезонную изменчивость, связанную с сезонными изменениями среды обитания. Бактерии в кишечнике моллюсков обладают большей ферментативной активностью, чем бактерии в среде обитания. Ферментативная активность кишечной микрофлоры моллюсков зависит от их типа питания.
3. Спирохеты присутствуют в кишечнике континентальных брюхоногих моллюсков независимо от водоема и биотопа их обитания, а также механизма потребления пищи и ее состава.

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на Пятой Верещагинской Байкальской конференции, г. Иркутск (октябрь, 2010), на II Международной научной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии», г. Улан-Удэ (июнь, 2011), на 3-м Байкальском Микробиологическом симпозиуме с международным участием «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах», г. Иркутск (ноябрь, 2011).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 статьи в ведущих рецензируемых журналах, входящих в список ВАК, 1 статья в зарубежном журнале, включенном в системы цитирования Web of Science и Springer с импакт-фактором 1,214, 1 статья в сборнике, 3 публикации в тезисах конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка литературы и 4 приложений. Работа изложена на 134 страницах, содержит 14 таблиц и 24 рисунка. Список литературы включает 177 наименований, из которых 137 зарубежных изданий.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность научному руководителю к.б.н., доценту В.В. Парфеновой и научному консультанту д.б.н. Т.Я. Ситниковой за постановку задач, помощь в проведении исследований, анализе и обсуждении результатов. Автор благодарен к.б.н. Е.Г. Сорокиковой и к.б.н. Е.Д. Бедошвили за оказанную помощь в освоении и проведении ТЭМ, к.б.н. Н.В. Кулаковой за неоценимую помощь в освоении и проведении молекулярно-генетических исследований, И.В. Ханаеву и к.б.н. Л.А. Прозоровой (БПИ ДВО РАН) за помощь в сборе материала, др. Э. Мичел (Лондон), а также сотрудникам отделов микробиологии и ультраструктуры клетки, лабораторий водных беспозвоночных и аналитической биоорганической химии Лимнологического института СО РАН. Особую благодарность приношу своим родным за моральную и финансовую поддержку.

# СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре описаны различные типы симбиотических взаимодействий между микроорганизмами и беспозвоночными животными. Детально рассмотрено биоразнообразие кишечной микрофлоры морских и пресноводных моллюсков. Описаны распределение микрофлоры в пищеварительном тракте беспозвоночных и влияние внешних и внутренних факторов на её состав, численность и на характер колонизации. Приведены сведения о подразделении микрофлоры кишечного тракта беспозвоночных на транзитную и резидентную. Показана роль симбионтных микроорганизмов в физиологических процессах моллюсков и других беспозвоночных животных. Представлено описание анатомических и физиологических особенностей строения пищеварительной системы переднежаберных и легочных брюхоногих моллюсков. Приведена морфология желудка байкальских брюхоногих моллюсков вида *B. baicalensis*. Отдельно рассмотрены история изучения и приведены современные данные о бактериях семейства Spirochaetaceae, обитающих в кристаллическом стебельке свыше 60 видов морских двустворчатых и нескольких видов пресноводных брюхоногих моллюсков.

## Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Объектами исследования послужили 16 видов байкальских брюхоногих моллюсков, отобранных в 2008–2011 гг. в различных районах озера Байкал в разные сезоны года, по одному виду брюхоногих моллюсков из Каспийского моря, водоемов Дальнего Востока и Северной Америки.

### 2.2. Методы исследования

Для обнаружения и изучения морфологии клеток спирохет применили методы **сканирующей (СЭМ) и трансмиссионной (ТЭМ) электронной микроскопии**. Образцы фиксировали по стандартной методике. СЭМ проводили на Philips 525. Метод СЭМ использовали для изучения формы клетки и спирали спирохет. Для ТЭМ серийные срезы получили на микротоме Ultracut R «Leica», Австрия, которые анализировали на ТЭМ Leo 906E «Carl Zeiss», Германия. Микрофотографии получили с помощью цифровой камеры MegaView II «LEO Elektronenmikroskopie GmbH», Германия.

**Подсчет и выделение бактерий** проводили с помощью чашечного метода Коха на дифференциально-диагностических средах. Выросшие колонии бактерий отсеивали в чистую культуру. Для идентификации бактерий до рода проводили соответствующее бактериоскопическое и бактериологическое исследование (Родина, 1965; Практикум по

микробиологии, 1976; Определитель бактерий Берджи, 1997). Препараты для микроскопии анализировали на световых микроскопах Olympus TOU1 и Carl Zeiss Jena (видеокамера Olympus). Колонии бактерий, выросшие на дифференциально-диагностической среде для колиформных бактерий, тестировали на принадлежность к семейству Enterobacteriaceae и определяли до вида (Практикум по микробиологии, 1976; МУК 4.2.1018-01).

Все выделенные штаммы тестировали на активность по следующим ферментам: протеазы, амилазы, липазы и лецитиназы. После проведенной идентификации культуры бактерий, выделенные из пищевого комка, фекалий моллюсков *B. baicalensis* и *L. auricularia*, придонной воды и грунта, были собраны в коллекцию.

Для молекулярно-генетической характеристики микрофлоры пищеварительного тракта моллюсков проводили скрининг 16S рРНК. Для ПЦР-амплификации использовали универсальные праймеры, фланкирующие фрагмент гена 16S рРНК длиной 1500 нуклеотидов. Определение нуклеотидных последовательностей проводили на автоматическом секвенаторе SEQ-8800 (Beckman Coulter, США). Филогенетический анализ проводили в программе MEGA v.5.0. Для реконструкции филогенетических деревьев использовали программы Neighbor joining, NJ и Maximum Likelihood, ML. Классификацию бактерий проводили по Пиневицу (Пиневиц, 2007).

Исследование морфологии спирохет проведено по схеме, предложенной Маргулис и Хинкл (Margulis, Hinkle, 2006). Для измерения клеток спирохет использовали программу Image-Pro plus 6.0.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ Microsoft Excel, STATISTICA 6.0 и Past 1.46. Для выявления различий по численности бактерий той или иной группы у обоих видов моллюсков применили тест Mann–Whitney, используемый для непараметрического сравнения двух независимых выборок (Logan, 2010).

### **Глава 3. БИОРАЗНООБРАЗИЕ, ЧИСЛЕННОСТЬ И ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ КИШЕЧНИКА МОЛЛЮСКОВ**

#### **3.1. Таксономическое разнообразие культивируемых бактерий кишечника моллюсков**

За время проведения исследований из кишечника моллюсков выделили 438 штаммов чистых культур, 350 из которых у моллюсков *B. baicalensis* и 88 у моллюсков *L. auricularia*. Из них 149 отнесли к семейству Enterobacteriaceae. В среде обитания выделили 158 штаммов, из них 16 отнесли к семейству Enterobacteriaceae. Штаммы энтеробактерий идентифицировали до вида.

Доминирующей культивируемой бактериальной микрофлорой в кишечном тракте обоих исследованных видов моллюсков является группа

неферментирующих грамотрицательных палочек (НГОП) с частотой встречаемости 61,4 % для моллюсков *B. baicalensis* и 40,9 % для *L. auricularia*. НГОП представлены в основном родом *Pseudomonas*. Реже встречались роды *Acinetobacter*, *Flavobacterium* и *Alcaligenes*. Преобладающую группу у моллюсков *B. baicalensis* представили энтеробактерии – 34,6 %; у *L. auricularia* – энтеробактерии (31,8 %), а также спорообразующие грамположительные палочки (СОГПП) рода *Bacillus* и грамположительная кокковая флора (ГПК) родов *Staphylococcus* и *Micrococcus* (27,3 %). У моллюсков *B. baicalensis* ГПК и СОГПП выделены с меньшей частотой встречаемости – 4 % (табл. 1).

Из пищевого комка (ПК) и фекалий (ФЕК) моллюсков *B. baicalensis* выделено и идентифицировано до вида 85 штаммов колиформных бактерий и 8 штаммов из пищевого комка и фекалий моллюсков *L. auricularia*.

Таблица 1

Количество выделенных штаммов из кишечника и среды обитания моллюсков *B.baicalensis* и *L. auricularia*

Род	Число выделенных штаммов / частота встречаемости у <i>B. baicalensis</i> , %		Число выделенных штаммов / частота встречаемости у <i>L. auricularia</i> , %		Число выделенных штаммов / частота встречаемости в среде обитания, %
	ПК	ФЕК	ПК	ФЕК	
НГОП	106,0 / <b>64,2</b>	109,0 / <b>58,9</b>	12,0 / <b>29,3</b>	24,0 / <b>51,1</b>	56,0 / <b>37,8</b>
<i>Pseudomonas</i>	84,0 / <b>79,2</b>	80,0 / <b>73,4</b>	10,0 / <b>83,3</b>	14,0 / <b>58,3</b>	36,0 / <b>64,3</b>
<i>Acinetobacter</i>	7,0 / <b>6,6</b>	13,0 / <b>11,9</b>	0	2,0 / <b>8,3</b>	10,0 / <b>17,9</b>
<i>Alcaligenes</i>	0	5,0 / <b>4,6</b>	0	5,0 / <b>20,8</b>	2,0 / <b>3,6</b>
<i>Flavobacterium</i>	15,0 / <b>14,2</b>	11,0 / <b>10,1</b>	2,0 / <b>16,7</b>	3,0 / <b>12,5</b>	8,0 / <b>14,3</b>
<i>Enterobacteriaceae</i>	50,0 / <b>30,3</b>	71,0 / <b>38,4</b>	13,0 / <b>31,7</b>	15,0 / <b>31,9</b>	16,0 / <b>10,8</b>
<i>Escherichia</i>	7,0 / <b>14,0</b>	25,0 / <b>35,2</b>	2,0 / <b>15,4</b>	1,0 / <b>6,7</b>	1,0 / <b>6,3</b>
<i>Citrobacter</i>	3,0 / <b>6,0</b>	5,0 / <b>7,0</b>	1,0 / <b>7,7</b>	4,0 / <b>26,7</b>	2,0 / <b>12,5</b>
<i>Enterobacter</i>	29,0 / <b>58,0</b>	31,0 / <b>43,7</b>	6,0 / <b>46,2</b>	4,0 / <b>26,7</b>	4,0 / <b>25,0</b>
<i>Klebsiella</i>	11,0 / <b>22,0</b>	10,0 / <b>14,1</b>	4,0 / <b>30,8</b>	6,0 / <b>40,0</b>	9,0 / <b>56,3</b>
<i>Bacillus</i>	4,0 / <b>3,1</b>	1,0 / <b>0,6</b>	10,0 / <b>24,4</b>	6,0 / <b>12,8</b>	42,0 / <b>28,6</b>
ГПК	5,0 / <b>3,0</b>	4,0 / <b>2,2</b>	6,0 / <b>14,6</b>	2,0 / <b>4,3</b>	34,0 / <b>23,0</b>
<i>Staphylococcus</i>	5,0 / <b>100,0</b>	2,0 / <b>50,0</b>	6,0 / <b>100,0</b>	1,0 / <b>50,0</b>	15,0 / <b>44,1</b>
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	2,0 / <b>5,9</b>
<i>Micrococcus</i>	0	2,0 / <b>50,0</b>	0	1,0 / <b>50,0</b>	17,0 / <b>50,0</b>
Итого	165	185	41	47	148

\*Расчет процентной доли встречаемости каждого рода проводили от числа выделенных штаммов каждой группы.

Выделенные из моллюсков бактерии семейства *Enterobacteriaceae* были представлены 4 родами: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Klebsiella*. Наиболее часто встречался род *Enterobacter*. Частота встречаемости составила 49,6 % у *B. baicalensis* и 35,7 % у *L. auricularia* (доминирующий вид *E. agglomerans*) (табл. 2). Остальные штаммы,



представленные родом *Bacillus* и грамположительной кокковой бактериофлорой, присутствовали в меньшем количестве.

Таблица 2

Количество выделенных штаммов колиформных бактерий из кишечника и среды обитания моллюсков *B. baicalensis* и *L. auricularia*

Род, вид	Число выделенных штаммов / частота встречаемости у <i>B. baicalensis</i> , %		Число выделенных штаммов / частота встречаемости у <i>L. auricularia</i> , %		Число выделенных штаммов / частота встречаемости в среде обитания, %
	ПК	ФЕК	ПК	ФЕК	
Род <i>Escherichia</i>	7,0 / <b>14,0</b>	25,0 / <b>35,2</b>	2,0 / <b>15,4</b>	1,0 / <b>6,7</b>	1,0 / <b>6,3</b>
<i>E. coli</i>	7,0 / <b>14,0</b>	25,0 / <b>35,2</b>	2,0 / <b>15,4</b>	1,0 / <b>6,7</b>	1,0 / <b>6,3</b>
Род <i>Citrobacter</i>	3,0 / <b>6,0</b>	5,0 / <b>7,0</b>	1,0 / <b>7,7</b>	4,0 / <b>26,7</b>	2,0 / <b>12,5</b>
<i>C. freundii</i>	0	2,0 / <b>2,8</b>	0	0	0
<i>C. diversus</i>	3,0 / <b>6,0</b>	3,0 / <b>4,2</b>	1,0 / <b>7,7</b>	4,0 / <b>26,7</b>	2,0 / <b>12,5</b>
Род <i>Enterobacter</i>	29,0 / <b>58,0</b>	31,0 / <b>43,7</b>	6,0 / <b>46,2</b>	4,0 / <b>26,7</b>	4,0 / <b>25,0</b>
<i>E. aerogenes</i>	10,0 / <b>20,0</b>	5,0 / <b>7,0</b>	1,0 / <b>7,7</b>	0	0
<i>E. agglomerans</i>	14,0 / <b>28,0</b>	19,0 / <b>26,8</b>	4,0 / <b>30,8</b>	4,0 / <b>26,7</b>	3,0 / <b>18,8</b>
<i>E. cloacae</i>	4,0 / <b>8,0</b>	5,0 / <b>7,0</b>	0	0	0
<i>E. gergoviae</i>	1,0 / <b>2,0</b>	2,0 / <b>2,8</b>	1,0 / <b>7,7</b>	0	1,0 / <b>6,3</b>
Род <i>Klebsiella</i>	11,0 / <b>22,0</b>	10,0 / <b>14,1</b>	4,0 / <b>30,8</b>	6,0 / <b>40,0</b>	9,0 / <b>56,3</b>
<i>K. oxytoca</i>	8,0 / <b>16,0</b>	7,0 / <b>9,9</b>	3,0 / <b>23,1</b>	6,0 / <b>40,0</b>	7,0 / <b>43,8</b>
<i>K. pneumoniae</i>	3,0 / <b>6,0</b>	3,0 / <b>4,2</b>	1,0 / <b>7,7</b>	0	2,0 / <b>12,5</b>

\*Расчет процентной доли встречаемости каждого рода проводили от числа выделенных штаммов каждой группы.

В среде обитания моллюсков доминировала грамположительная микрофлора: кокки и спорообразующие палочки составили 51,4 %, 37,8 % – НГОП, а энтеробактерии – 10,8 %. Среди НГОП также преобладали бактерии рода *Pseudomonas* (64,3 %), а среди колиформов чаще всего встречался род *Klebsiella* (56,3 %). Результаты исследований родового и видового разнообразия НГОП и энтеробактерий, выделенных из кишечника моллюсков и их среды обитания, сходны с результатами исследования биоразнообразия НГОП и энтеробактерий в Южном Байкале (Панасюк и др., 2002).

### 3.2. Молекулярно-генетическое исследование разнообразия микрофлоры кишечника моллюсков

В результате молекулярно-генетического анализа выявлены филогенетические группы Bacteroidetes и Tenericutes, и классы Alpha-, Beta- и Gammaproteobacteria (рис. 1). Наибольшая идентичность наблюдается с последовательностями, полученными из некультивируемой биоты пресной и морской воды, а также микрофлоры пищеварительного тракта моллюсков, ракообразных и насекомых.

Выявленные последовательности оказались наиболее идентичны родам *Pseudomonas* и *Flavobacterium* (идентичность составила 59–100 %), что совпадает с результатами проведенного культивирования. Также обнаружены

роды азотфиксирующих бактерий *Ochrobactrum* и хитинолитических бактерий *Deefgea* и *Chitinibacter* – широко распространённые в воде и почве (Schloter *et al.*, 2000; Stackebrandt *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2011).

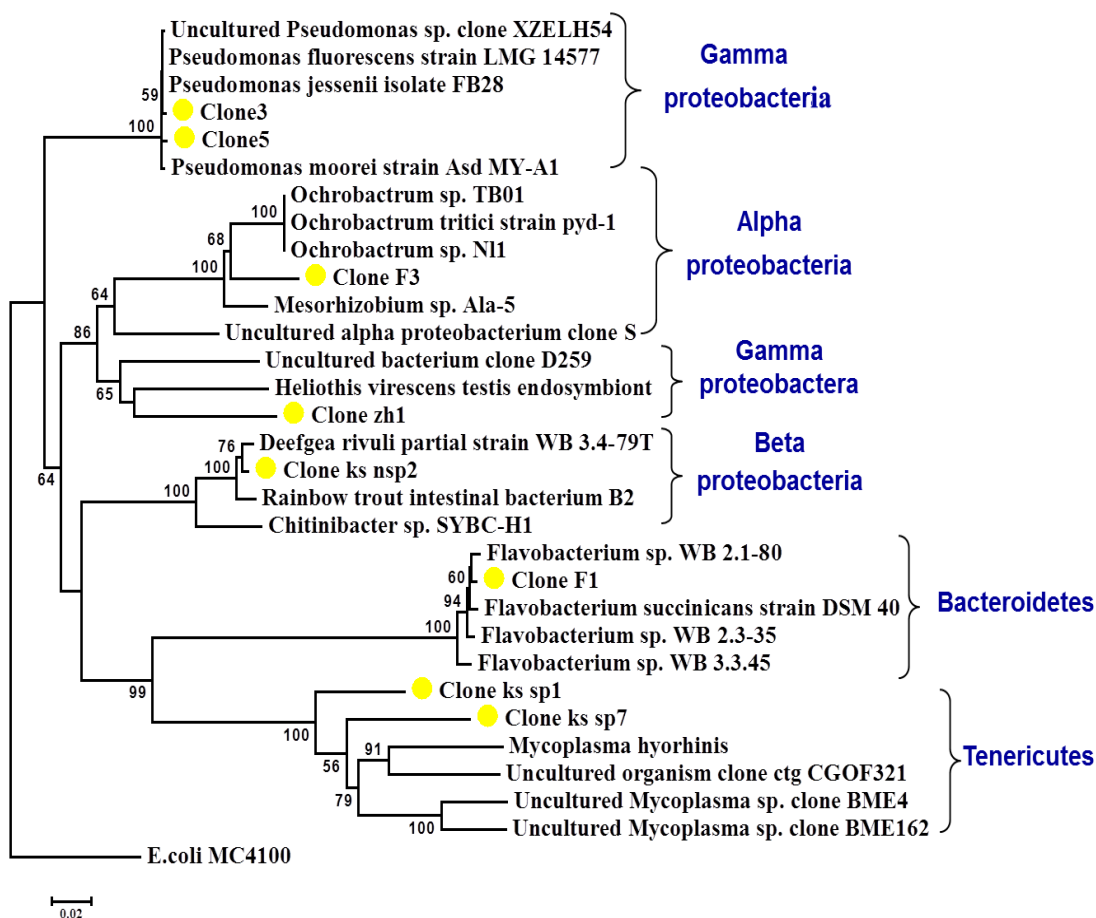


Рис. 1. Филогенетический анализ микрофлоры кишечника моллюсков *Benedictia baicalensis*.

Сходство 76 % найдено с бактериями, обнаруженными в кишечнике радужной форели (Navarrete *et al.*, 2010). Идентичность 79 % обнаружена с некультивируемыми представителями рода *Mycoplasma*, ассоциированными с кораллами (Neulinger *et al.*, 2009). Известно, что микоплазмы часто являются паразитами в жаберных клетках рыб и встречаются в эпителиальных клетках кишечника моллюсков (Hine, Diggles, 2002; Суханова и др., 2011; Adan-Kubo *et al.*, 2012, King *et al.*, 2012).

### 3.3. Численность и распределение бактерий в кишечнике моллюсков

Среднее количество общих органотрофных бактерий в 1 мл содержимого желудка составило у *B. baicalensis* –  $131,6 \pm 49,8 \times 10^5$  кл, у *L. auricularia* –  $9,9 \pm 6,5 \times 10^5$  кл; в фекалиях, соответственно,  $139,6 \pm 52,1 \times 10^5$  кл/мл и  $10,04 \pm 3,91 \times 10^5$  кл/мл.

За весь период исследований численность культивируемых мезофильных гетеротрофов в кишечнике моллюсков *B. baicalensis* колебалась от  $8,4 \pm 3,1 \times 10^5$  до  $12660,0 \pm 184,1 \times 10^5$  кл/мл, в придонной воде и грунте – от  $5,0 \pm 0,1$  до  $110000 \pm 353,6$  кл/мл. Численность олиготрофных и

психрофильных бактерий в кишечнике моллюсков составила  $3,5 \pm 2,8 \times 10^5 - 1716,0 \pm 159,5 \times 10^5$  кл/мл и  $3,3 \pm 2,8 \times 10^5 - 2089,0 \pm 197,8 \times 10^5$  кл/мл; в среде обитания  $7,0 \pm 0,7 - 23250 \pm 39,0$  кл/мл и  $36,0 \pm 7,8 - 33300,0 \pm 99,0$  кл/мл, соответственно.

Выявлены весенний (апрель–май) и осенний (сентябрь) пики численности гетеротрофных, олиготрофных и психрофильных бактерий в кишечнике моллюсков и в среде обитания (рис. 2, 3). Сезонные изменения численности бактерий в среде обитания моллюсков сходные с сезонной динамикой общей численности бактерий в грунтах Южного Байкала (Максимова, Ерентенко, 1988).

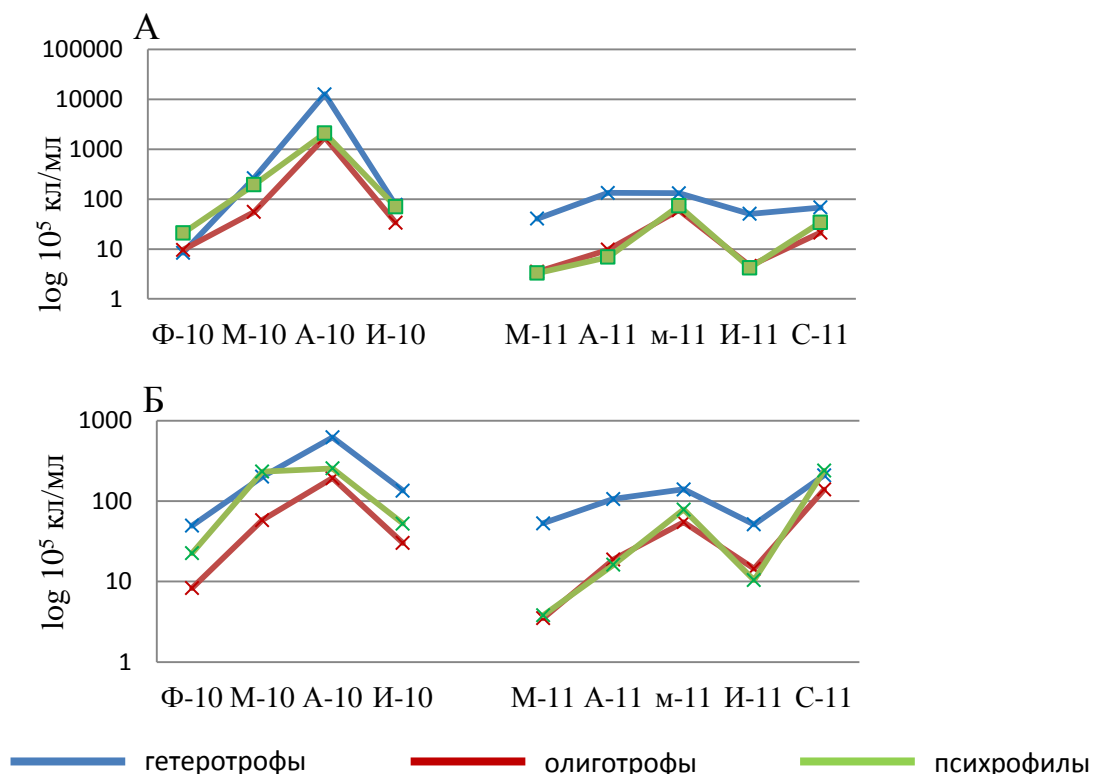


Рис. 2. Сезонная динамика гетеротрофных, олиготрофных и психрофильных бактерий, выделенных из пищевого комка (А) и фекалий (Б) моллюсков *V. baicalensis* в 2010 и 2011 гг.

Численность энтеробактерий в кишечнике моллюсков *V. baicalensis* за весь период исследований колебалась от  $7,9 \pm 12,0 \times 10^3$  до  $522,7 \pm 337,2 \times 10^3$  кл/мл в пищевом комке,  $3,3 \times 10^3 \pm 1,4 - 3924,6 \pm 318,6 \times 10^3$  кл/мл в фекалиях. Количество энтеробактерий в кишечнике моллюсков *L. auricularia* (анализ проводили в июне 2011 г.) составило в пищевом комке  $53,5 \pm 23,1$  кл/мл, в фекалиях –  $187,4 \pm 10,2$  кл/мл. В среде обитания моллюсков колиформные бактерии либо не детектировались стандартными методами культивирования, либо их количество было небольшим, достигая максимальных значений в апреле и сентябре 2011 г. ( $141,0 \pm 1,3$  кл/мл и  $5720,0 \pm 1,4$  кл/мл, соответственно). Выявлены зимний (февраль – март) и осенний (сентябрь) пики численности энтеробактерий. Сезонные колебания численности энтеробактерий в среде обитания соответствовали таковым у остальных исследованных групп бактерий (рис. 4).

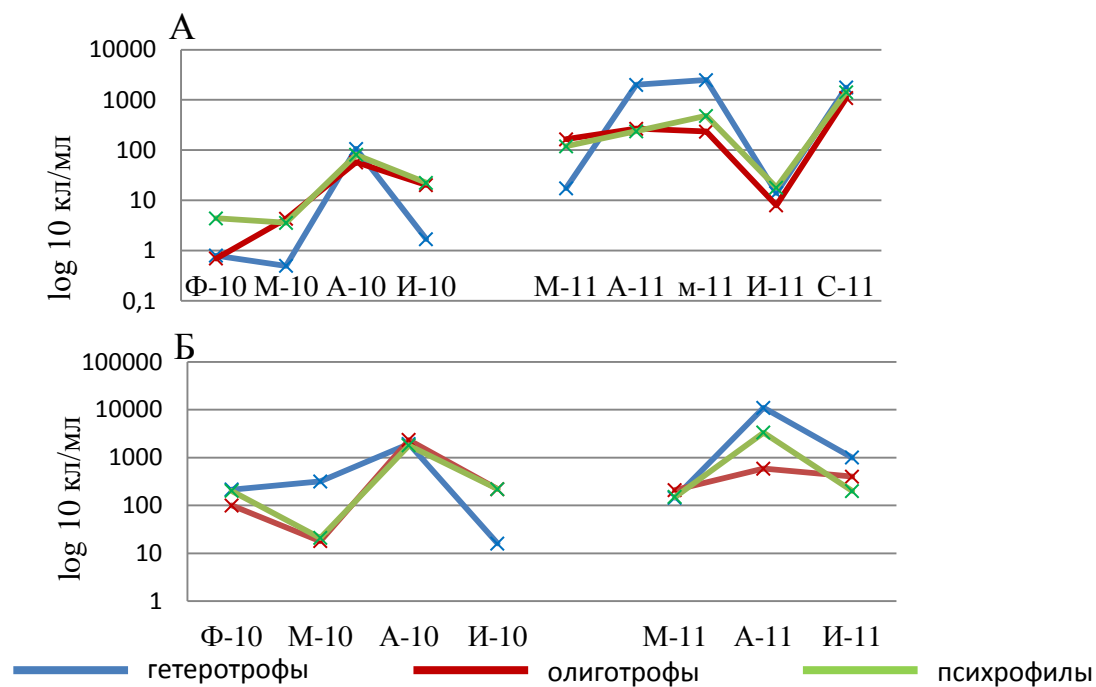


Рис. 3. Сезонная динамика численности гетеротрофных, олиготрофных и психрофильных бактерий, выделенных из придонной воды (А) и грунта (Б) в 2010 и 2011 гг.

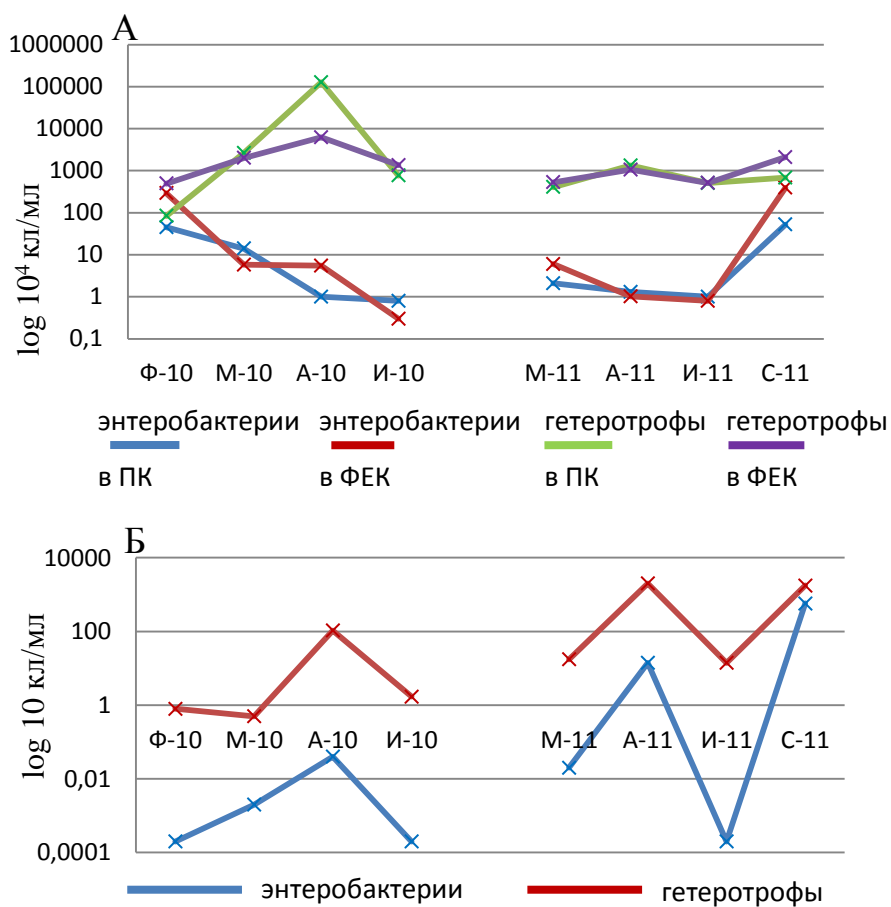


Рис. 4. Численность гетеротрофных бактерий и энтеробактерий в пищевом комке, фекалиях моллюсков *B. baicalensis* (А) и придонной воде (Б) в 2010 и 2011 гг.

При обработке данных с помощью теста Mann–Whitney выявлено, что наибольшие достоверные различия по бактериальной численности замечены

между зимним и осенним периодами ( $p < 0,05$  для гетеротрофов в фекалиях, колиформов в пищевом комке и фекалиях, олиготрофов и психрофилов фекалиях).

Анализ полученных данных по численности культивируемых бактерий в пищеварительном тракте моллюсков позволяет сделать вывод, что сезонные колебания численности гетеротрофных бактерий в пищеварительном тракте моллюсков и в среде их обитания соответствуют друг другу. Численность бактерий всех изучаемых групп в пищевом комке и фекалиях моллюсков на 4 порядка превышает таковую в окружающей моллюсков среде. Можно заключить, что поглощаемые моллюском гетеротрофные бактерии, не подверженные литическому воздействию пищеварительных ферментов, представляют транзиторную микрофлору его кишечника, а энтеробактерии являются их собственной симбионтной кишечной микрофлорой, так как находятся в обратной зависимости от колебаний бактерий в среде обитания моллюсков. В зимний период из-за снижения численности гетеротрофов в среде обитания моллюсков их собственная колиформная микрофлора дополняет гетеротрофную, участвуя в расщеплении органических компонентов пищи, а в весенний период энтеробактерии снова вытесняются поступающими из внешней среды гетеротрофами.

#### **3.4. Ферментативная активность бактерий, выделенных из кишечника моллюсков**

Коллекцию штаммов, выделенную из кишечника моллюсков, тестировали на амилолитическую, протеолитическую, липолитическую и лецитиназную активность. Известно, что ферменты, обладающие данными активностями, необходимы для расщепления углеводов, белков и жиров пищи у моллюсков и рыб (Sugita *et al.*, 1997; Chaston J. and Goodrich-Blair, 2010).

По результатам исследования в кишечнике моллюсков ферментативно-активные штаммы составили 93,4 %, а 6,6 % штаммов не проявили ни одной из тестируемых активностей. Всеми ферментами обладали 44,8 % штаммов. В среде обитания ферментативно-активные штаммы составили 71,3 %, не проявили активность 28,7 %. Всеми ферментами обладали 16,5 % штаммов.

И в пищеварительном тракте, и в окружающей среде доминировали штаммы с амилазной активностью (в кишечнике *V. baicalensis* 88,1 %, у *L. auricularia* 84,1 %; в среде обитания 53,4 %), встречаемость штаммов с протеолитической активностью составила 71,0 %, 53,4 % и 40,9 %, соответственно. Процент встречаемости штаммов из кишечника моллюсков *V. baicalensis*, обладающих ферментами липазой и лецитиназой, также был высоким, составляя 65,7 % и 61,7 %. У штаммов из кишечника моллюсков *L. auricularia* и штаммов из среды обитания процент встречаемости составил 39,8 % и 46,6 %, 33,8 % и 25,7 %, соответственно.

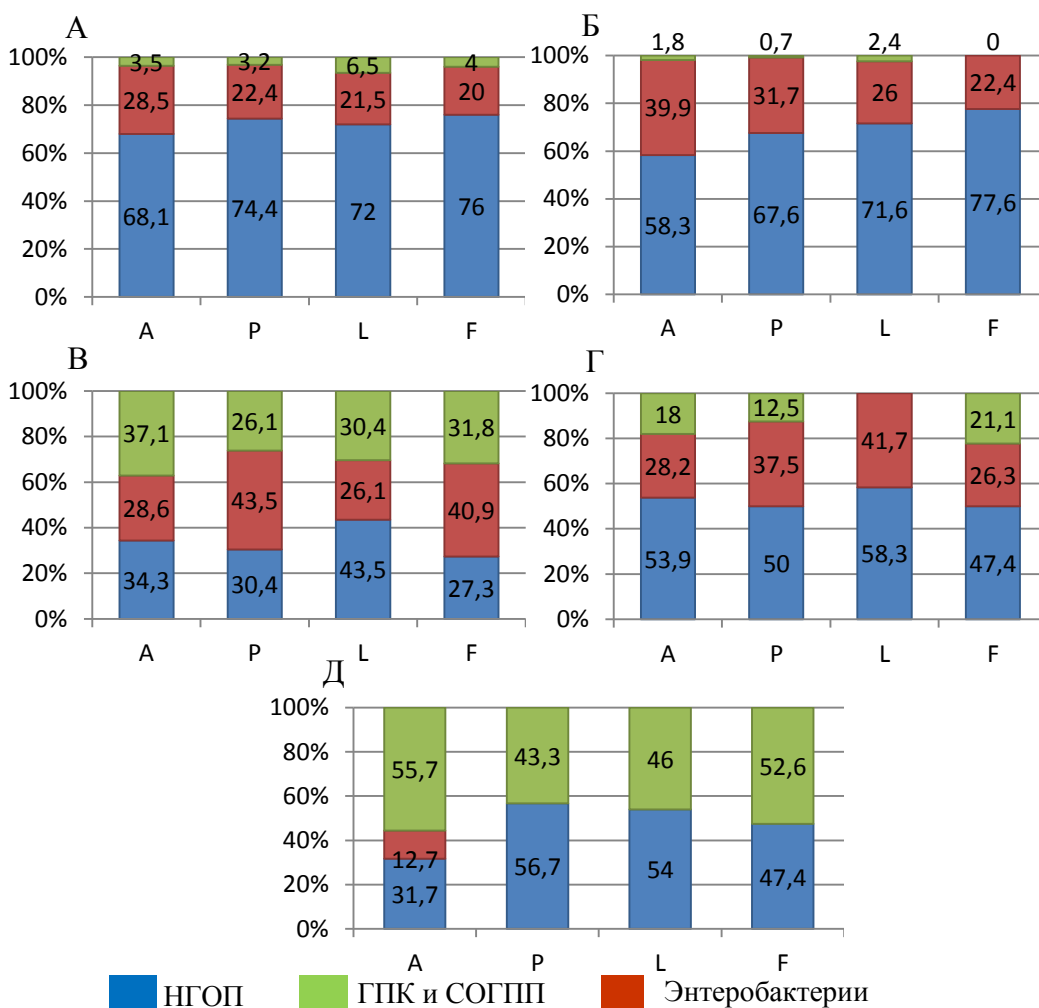


Рис. 5. Ферментативная активность различных групп бактерий, выделенных из пищевого комка (А) и фекалий (Б) моллюсков *B. baicalensis*, из пищевого комка (В) и фекалий (Г) моллюсков *L. auricularia*; и среды обитания (Д): А – амилаза, Р – протеаза, L – липаза, F –лецитиназа.

Необходимо отметить, что наибольшей ферментативной активностью обладали бактерии из группы НГОП, которую на 76,3 % составляют штаммы рода *Pseudomonas*. Штаммы НГОП, выделенные из кишечника моллюсков *B. baicalensis*, обладали в 91,2 % амилолитической, 87,0 % протеолитической, 76,7 % липолитической и 77,2 % лецитинолитической активностью. Процент штаммов НГОП из кишечника моллюсков *L. auricularia* составил для амилолитических бактерий 91,7 %, протеолитических – 52,8 %, липолитических – 47,2 % и лецитинолитических – 41,7 %. Штаммы НГОП, выделенные из среды обитания, обладали в основном протеазной активностью (60,7 %); амилазную, липазную и лецитиназную активность проявили 44,6 %, 48,2 % и 32,1 %, соответственно.

У штаммов группы ГПК и СОГПП из кишечника *B. baicalensis* чаще обнаруживались липаза (71,4 %) и амилаза (57,1 %), а в кишечнике *L. auricularia* и в среде обитания преобладали бактерии с амилолитической активностью (83,3 % и 57,9 %, соответственно). У всех штаммов энтеробактерий доминировали также штаммы с амилолитической

активностью (89,3 % у *B. baicalensis*, 75 % у *L. auricularia*, 81,3 % в среде обитания).

Также необходимо отметить, что в кишечнике моллюсков *B. baicalensis* ферментативно-активные бактерии, в основном, представлены группой НГОП и, в меньшей степени, семейством энтеробактерий. Доля ГПК и СОГПП была минимальной. У моллюсков вида *L. auricularia* явного преобладания процентной доли той или иной группы штаммов не выявлено. В среде обитания бактерии группы НГОП, ГПК и СОГПП проявили ферментативную активность практически в равной степени, группа энтеробактерий имела только амилолитическую активность в 12,7 % (рис. 5).

Полученные данные позволяют утверждать, что бактерии в кишечнике моллюсков обладают в большинстве своем амилолитической и протеолитической активностью в отличие от среды обитания, где не выявлено преобладания штаммов с исследуемыми ферментами. Преобладание амилолитических и протеолитических бактерий в кишечнике *B. baicalensis* подтверждает их всеядный тип питания. В связи с преобладанием амилолитических бактерий в кишечнике *L. auricularia* можно заключить, что бактерии, выделенные из их кишечника, принимают участие в переваривании пищи преимущественно растительного характера.

## ГЛАВА 4. БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА SPIROCHAETACEAE В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ СТЕБЕЛЬКЕ БАЙКАЛЬСКИХ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ

### 4.1. Численность и распределение спирохет

Спирохеты обнаружены у 14 из 19 исследованных видов брюхоногих моллюсков, десять из них – эндемики Байкала (рис. 8). Кроме эндемичных для Байкала видов моллюсков спирохеты найдены у северо-азиатской улитки *Boreoelona contortrix* (Lindholm, 1909) (Bithyniidae), обычной для северных заливов озера и прилегающих к нему водоемов, а также у северодальневосточного вида *Kolhymannicola ochotica* (Amnicolidae), североамериканского вида *Fluminicola hidnsi* (Lythoglyphidae), каспийского вида *Turricaspiia turricula*.

Количество спирохет внутри кристаллического стебелька моллюсков вида *B. baicalensis* на площади 100 мкм<sup>2</sup> варьировало от 6 до 50 клеток. В пищевом комке и фекалиях спирохеты были обнаружены в единичных количествах.

### 4.2. Исследование морфологии клетки спирохет

С помощью световой и сканирующей электронной микроскопии выявлено, что спирохеты являются спиралевидными грамтрицательными бактериями длиной 17,6±4,8 (10,5–30,1) мкм и шириной 0,9±0,2 (0,6–1,2) мкм (рис. 6).

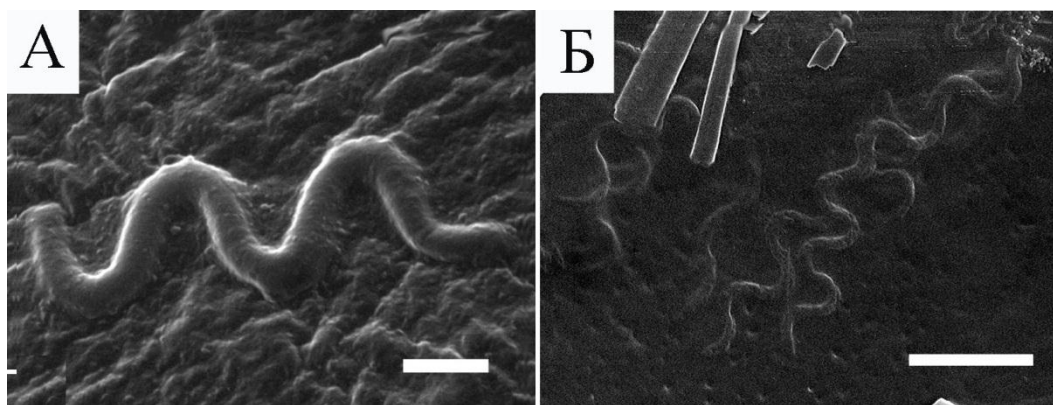


Рис. 6. Сканирующая электронная микроскопия кристаллического стебелька и желудочного содержимого *B. baicalensis*: А – спирохета на поверхности кристаллического стебелька (масштаб 2 мкм), Б – спирохеты в пищевой комке (масштаб 10 мкм).

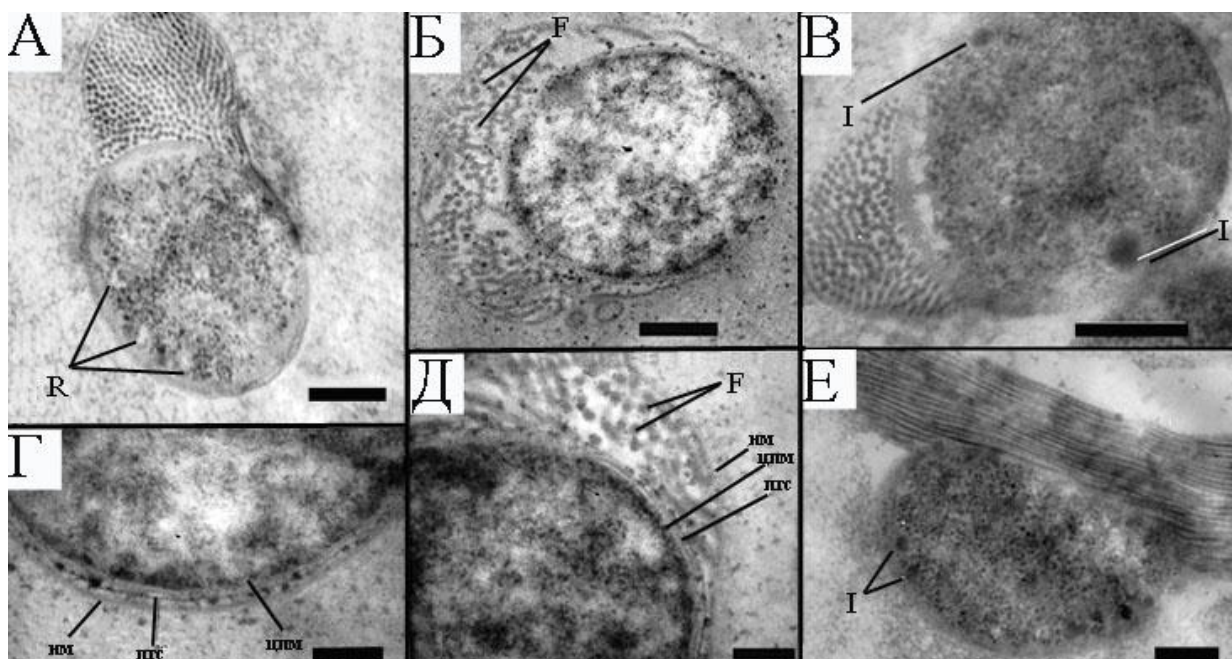


Рис. 7. Трансмиссионная электронная микроскопия исследуемых спирохет, поперечный срез через клетку: Г, Д – 100 нм. R – розетки; F – жгутики; I – включения; nm – наружная мембрана, пгс – пептидогликановый слой, цпм – цитоплазматическая мембрана. Масштаб А, Б, В, Е – 200 нм.

Проведенное исследование с помощью ТЭМ позволило обнаружить характерное для грамотрицательных бактерий трехслойное строение клеточной стенки, наличие более 100 периплазматических жгутиков, клеточных включений и «розеток» – структур, характерных для представителей рода *Cristispira* (рис. 7) (Тулупова и др., 2012).

#### 4.3. Дифференцирование спирохет байкальских брюхоногих моллюсков с представителями семейства Spirochaetaceae

Проведен сравнительно-морфологический анализ байкальских спирохет с 6 известными симбионтными родами семейства Spirochaetaceae. Показано, что исследованные бактерии по морфологии клетки соответствуют роду *Cristispira*, но от типового вида этого рода *C. pectinis*, ассоциированного с кристаллическим стебельком морских двустворок, отличаются меньшими



размерами клеток. У байкальских спирохет в 5 раз меньше длина, в 3 раза меньше длина волны и в 2,3 раза меньше амплитуда волны (Тулупова и др., 2012).

Высказано предположение, что спирохеты, ассоциированные с кристаллическим стебельком байкальских брюхоногих моллюсков, принадлежат к самостоятельному виду.

### 4.3. Встречаемость спирохет и экологические характеристики гастропод

Выявлено, что спирохеты присутствуют в кристаллическом стебельке байкальских брюхоногих моллюсков в течение всего года, т. е. их присутствие не связано с сезонностью питания улиток. На наличие спирохет не влияет обитание моллюсков в различных районах и биотопах Байкала как в литорали озера, так и в его глубоководной зоне. Выяснено, что спирохеты присутствуют у моллюсков, имеющих как различные механизмы потребления пищи (соскребание и фильтрация), так и различный рацион питания (растительно-, детрито- и всеядность) (рис. 8). Отсутствие спирохет у моллюсков, имеющих сходные пищевые стратегии, объяснимо отсутствием у них кристаллического стебелька в желудке. Высказано предположение, что желеобразное вещество кристаллического стебелька является своеобразным субстратом (питательной средой) для развития спирохет.

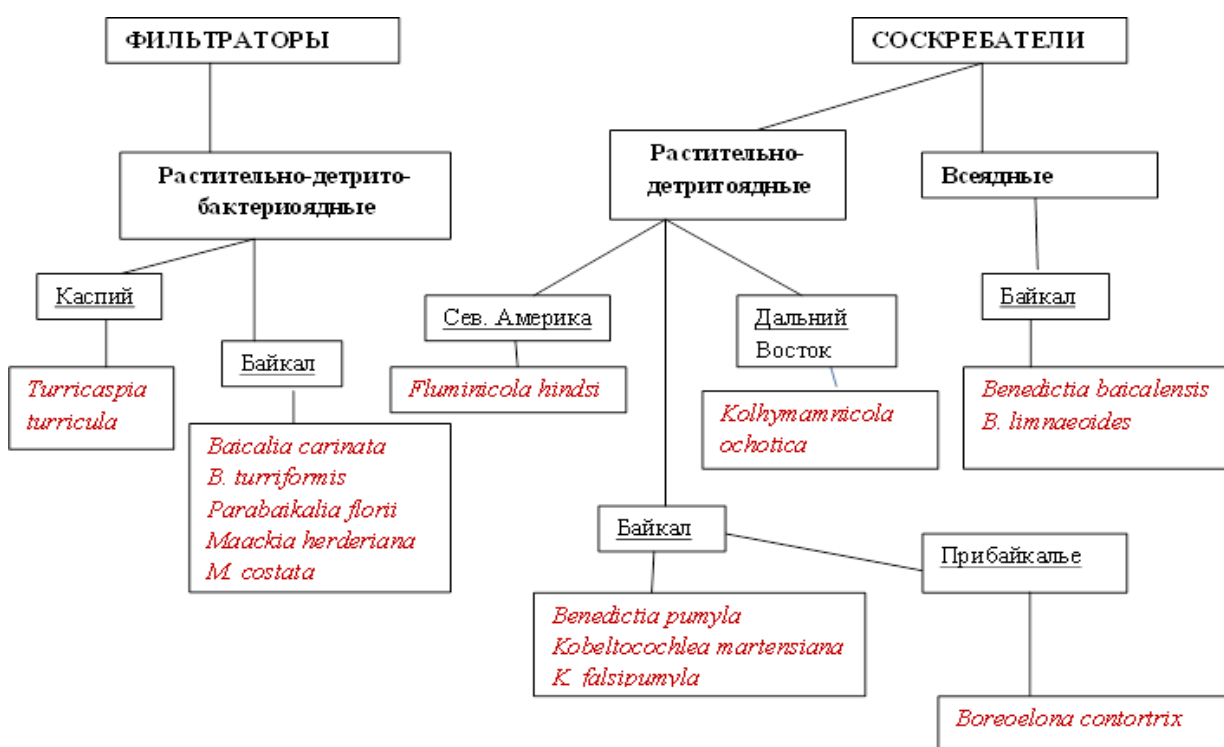


Рис. 8. Схема встречаемости спирохет у гастропод с разными пищевыми стратегиями.

Отсутствуют данные о наличии бактерий рода *Cristispira* в донных осадках литорали оз. Байкал. Спирохеты не найдены в кишечнике зрелых эмбрионов и вышедших из яиц улиток. Появление спирохет в их кишечнике

отмечено на 5 сутки. Заселение кишечника молодых моллюсков спирохетами происходит, вероятно, в результате поедания ими фекалий, оставленных взрослыми улитками, содержащими спирохеты (Sitnikova *et al.*, 2012; Ситникова и др., 2013).

Таким образом, микрофлора кишечника моллюсков представлена транзиторными и резидентными микроорганизмами, в том числе некультивируемыми бактериями (табл. 3).

Таблица 3

Микрофлора пищеварительного тракта байкальских брюхоногих  
МОЛЛЮСКОВ

Транзиторная микрофлора	Резидентная микрофлора
<p>Неферментирующие грамотрицательные палочки родов <i>Pseudomonas</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Alcaligenes</i>, <i>Flavobacterium</i>. Спорообразующие грамположительные палочки рода <i>Bacillus</i>. Грамположительные кокки родов <i>Staphylococcus</i> и <i>Micrococcus</i>. Азотфиксирующие бактерии рода <i>Ochrotrium</i>. Хитинолитические бактерии родов <i>Deefgea</i> и <i>Chitinibacter</i>.</p>	<p>Бактерии семейства Enterobacteriaceae: родов <i>Escherichia</i>, <i>Citrobacter</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>. Бактерии семейств Spirochaetaceae и Mucoplasmataceae.</p>

Транзиторная микрофлора представлена теми же группами бактерий, что и в среде обитания моллюсков, и поступает в их кишечник вместе с пищей при соскабливании ее со дна. Резидентная микрофлора включает обычные бактерии кишечной группы, способствующие перевариванию пищи, а также бактерии семейств Mucoplasmataceae и Spirochaetaceae.

## ВЫВОДЫ

1. Бактериальная микрофлора кишечника байкальских брюхоногих моллюсков эндемика *Benedictia baicalensis* и палеаркта *Lymnaea auricularia* представлена классами бактерий Alpha-, Beta-, Gammaproteobacteria, Flavobacteria, Bacilli, Mollicutes, Actinobacteria и Spirochaetes.
2. Транзиторную микрофлору составляют представители классов Alphaproteobacteria (род *Ochrotrium*), Betaproteobacteria (роды *Alcaligenes*, *Chitinibacter* и *Deefgea*), Gammaproteobacteria (роды *Pseudomonas* и *Acinetobacter*), Flavobacteria (род *Flavobacterium*), Bacilli (рода *Bacillus* и *Staphylococcus*) и Actinobacteria (род *Micrococcus*), найденные также в среде обитания моллюсков. Резидентная микрофлора представлена классами Gammaproteobacteria (сем. Enterobacteriaceae), Mollicutes (сем. Mucoplasmataceae) и Spirochaetes (сем. Spirochaetaceae). Энтеробактерии представлены 4 родами (*Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* и *Klebsiella*) с преобладанием в кишечнике гастропод рода

*Enterobacter* (доминирующий вид *E. gergoviae*). Энтеробактерии присутствовали в кишечнике моллюсков в течение всего периода исследований.

3. Максимальные значения численности бактерий в кишечнике моллюсков отмечены в апреле и сентябре. Сезонные колебания численности культивируемых гетеротрофных, олиготрофных и психрофильных бактерий кишечника моллюсков зависят от изменений численности бактерий в среде обитания. В кишечнике гастропод происходит сезонная смена численности гетеротрофных бактерий и энтеробактерий: в зимний период из-за снижения численности гетеротрофных бактерий увеличивается количество энтеробактерий; в весенний период с увеличением численности гетеротрофов количество энтеробактерий снижается; осенью количество энтеробактерий вновь увеличивается в связи с большей антропогенной нагрузкой в литоральной зоне Южного Байкала.
4. Ферментативная активность бактерий, выделенных из кишечника моллюсков, была выше, чем у бактерий, выделенных из среды обитания. Энтеробактерии и бактерии рода *Pseudomonas* составили самую большую по численности и ферментативной активности группу в кишечнике моллюсков *B. baicalensis*. В кишечнике *B. baicalensis* преобладали бактерии с амилолитической и протеолитической активностью, что подтверждает их разнообразный тип питания. В кишечнике *L. auricularia* преобладали бактерии с амилолитической активностью, что указывает на их питание растительной пищей.
5. Спирохеты обнаружены у 14 видов из 6 семейств брюхоногих моллюсков, населяющих Каспийское море, водоемы Дальнего Востока и Северной Америки, и различные биотопы оз. Байкал как в литорали, так и в глубоководной зоне, включая гидротермальный вент и метановый сип. Спирохеты обнаружены у байкальских моллюсков в течение всех сезонов года. Присутствие спирохет зависит от наличия специального органа у моллюсков – кристаллического стебелька, являющегося специфичной средой обитания для спирохет. По морфологическим признакам спирохеты, обнаруженные в кристаллическом стебельке континентальных брюхоногих моллюсков, принадлежат роду *Cristispira*, но отличаются по ряду признаков от типового вида *C. pectinis*.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Первые сведения о бактериях семейства Spirochaetaceae пищеварительного тракта эндемичных брюхоногих моллюсков озера Байкал / **Ю. Р. Тулупова** [и др.] // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – № 4. – С. 500–507.  
First report on bacteria of the family Spirochaetaceae from digestive tract of endemic gastropods from Lake Baikal / **Yu. R. Tulupova** [et al.] // Microbiology. – 2012. – V. 81. – № 4. – P. 460–467.
2. Новые находки бактерий-спирохет в кристаллическом стебельке пресноводных брюхоногих моллюсков / Т. Я. Ситникова, **Ю. Р. Тулупова** [и др.] // Известия РАН. Серия биологическая. – 2013. – Т. 40. – № 1. – С. 107–110.  
Novel spirochaetes in the crystalline style of fresh water gastropods / Т. Ya. Sitnikova, **Yu. R. Tulupova** [et al.] // Biology Bulletin. – 2013. – V. 40. – № 1. – P. 107–110.

### Статьи в журналах:

3. Spirochetes in gastropods from Lake Baikal and North American freshwaters: New multi-family, multi-habitat host records / Tatiana Sitnikova, Ellinor Michel, **Yulia Tulupova** [et al.] // Symbiosis. – 2012. – V. 56. – N. 3. – P. 103–110. DOI 10.1007/s13199-012-0167-1. импакт-фактор 1,214.

### Статьи в сборниках:

4. **Тулупова Ю. Р.** Предварительные исследования бактериальной микрофлоры байкальских брюхоногих моллюсков / **Ю. Р. Тулупова** // Водные экосистемы Сибири и перспективы их использования. – 2011. – С. 133–136.

### Материалы конференций:

5. Бактерии семейства Spirochaetaceae в кишечном тракте переднежаберного моллюска *Benedictia Baicalensis* (Gastropoda: Hydrobioidea) – эндемика озера Байкал / **Ю. Р. Тулупова** [и др.] // Пятая Верещагинская Байкальская конференция, Международная научная школа для молодежи «Экология крупных водоемов и их бассейнов», 16 Объединенный семинар по проблемам изучения региональных осадений из атмосферы: Тезисы докладов и стендовых сообщений (Иркутск, 4-9 октября 2010 г.). – Иркутск: Изд-во «Аспринт», 2010 – С.154-155.
6. **Тулупова Ю. Р.** Бактериальная микрофлора пищеварительного тракта байкальских брюхоногих моллюсков / **Ю. Р. Тулупова**, Е.Г. Сороковикова // Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии: Материалы II Междунар. научной конференции Улан-Удэ (Россия), 20–25 июня 2011 г. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2011 – С.241–243.
7. Исследование численности и разнообразия бактериальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта байкальских брюхоногих моллюсков / **Ю. Р. Тулупова** [и др.] // Материалы 3-го Байкальского Микробиологического симпозиума с международным участием. BSM-2011 (Иркутск, 3–8 октября 2011 г.) – Иркутск: Изд-во Института географии им. В.Б. Сочавы СО РАН, 2011. – С. 161–162.