

*На правах рукописи*



**ЛОБОВА Татьяна Ивановна**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ АВТОХТОННЫХ  
И АЛЛОХТОННЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ОЗЕРА ШИРА И МАРКЕРЫ  
АНТРОПОГЕННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ВОДНУЮ ЭКОСИСТЕМУ**

03.00.07 Микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Пермь - 2003

Работа выполнена в лаборатории управления биосинтезом гетеротрофов Института биофизики СО РАН, Красноярск

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

Попова Л.Ю.

**Научный консультант:**

доктор биологических наук, профессор  
заслуженный деятель науки РФ

Печуркин Н.С.

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор,  
заслуженный деятель науки РФ

Пшеничников Р.А.

доктор биологических наук, профессор

Дрюккер В.В.

**Ведущая организация:** Институт водных и экологических проблем ДВО РАН,  
Хабаровск

Защита диссертации состоится «5» сентября 2003 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 004.019.01 в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН по адресу: 614081 г. Пермь, ул. Голева, д. 13.  
Факс: (3422) 44 67 11.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Автореферат разослан «5» мая 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



Ившина И.Б.

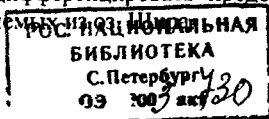
## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время проблема сохранения естественного разнообразия микрофлоры природных экосистем является актуальной проблемой в микробной экологии. Это обусловлено активной деятельностью человека, приводящей к негативным изменениям в окружающей среде. Одним из примеров таких изменений - устойчивость автохтонных бактерий к антибиотикам, распространяющаяся вследствие поступления в экосистемы патогенной и нормальной микрофлоры человека и животных. Передача генов антибиотикорезистентности от аллохтонных бактерий автохтонным бактериям может приводить к закреплению у них ранее не свойственных признаков и, в конечном итоге, нарушению взаимосвязей внутри микробных комплексов. Для того чтобы оценить такие изменения необходимо проведение мониторинга антропогенной нагрузки. Как правило, негативное влияние персистенции аллохтонных микроорганизмов на природные экосистемы оценивается по количественным показателям патогенных бактерий, как потенциальных возбудителей заболеваний человека (Панасюк и др., 2002; Chandrasekaran *et al.*, 1998; Lemke, Leff, 1999; McArthur, Tuckfield, 2000). Однако такой подход к оценке состояния окружающей среды не позволяет получать информацию об изменении свойств автохтонных бактерий вследствие присутствия аллохтонной микрофлоры в экосистеме, а также о степени изменений свойств автохтонных бактерий. В связи с этим представляется целесообразным использование признаков бактерий, отражающих антропогенное влияние и, следовательно, такие признаки могут быть рекомендованы в качестве маркеров. Исследователи, занимающиеся проблемами экологии микроорганизмов, в частности экологи водных микроорганизмов, подчеркивают достоинства использования маркерных признаков бактерий для оценки антропогенной нагрузки (Wireman *et al.*, 1997; Guardabassi *et al.*, 1998; Lenski, 1998; Wiggins *et al.*, 1999). При этом множественная устойчивость бактерий к антибиотикам является показателем негативного влияния деятельности человека на природные экосистемы (Briggs *et al.*, 1999; Lemke, Leff, 1999; Mary *et al.*, 2000). Однако мало кто из исследователей изучает влияние человека на экосистемы в динамике (по годам и по сезонам). Только в результате систематических наблюдений за маркерными характеристиками бактерий, а также степенью их выраженности можно определить природу действующего фактора и характер его проявления в разных компонентах экосистемы. В данной работе используется именно такой подход проведения мониторинговых исследований в водных экосистемах.

**Цель настоящего исследования** - изучение биологических особенностей автохтонных и аллохтонных бактерий из оз. Шира (республика Хакасия) и выявление маркеров антропогенного воздействия на водную экосистему.

**Основные задачи исследования:**

1. Исследовать психро- и галотолерантные свойства, а также антибиотикочувствительность бактерий, изолированных из оз. Шира.
2. Выявить признаки, позволяющие дифференцировать представителей автохтонных и аллохтонных бактерий, выделяемых из оз. Шира.



3. Изучить антибиотикочувствительность представителей автохтонных и аллохтонных бактерий, выделяемых в разные сезоны из разных зон оз. Шира.

4. Выявить маркеры негативного антропогенного воздействия на водную экосистему.

**Научная новизна работы.** Изучены биологические особенности и выявлены признаки, связанные с экологической специализацией автохтонных и аллохтонных бактерий, изолированных из оз. Шира. Показано, что представители автохтонных бактерий характеризуются способностью к росту при низкой ( $5^{\circ}\text{C}$ ) температуре, а также в присутствии высоких (10%) концентрациях хлорида натрия. У аллохтонных бактерий не выявлены признаки психро- и галотолерантности, они характеризуются повышенной антибиотикорезистентностью и обнаруживаются в участках водной экосистемы, испытывающих наиболее сильное антропогенное воздействие. Экспериментально обосновано, что тест на чувствительность к ампициллину и канамицину может быть использован при оценке негативного антропогенного воздействия на оз. Шира. Исследован плазмидный профиль выделенных бактерий и обнаружены плазмиды размером от 2,7 до 12,7 т.п.н. Впервые показано, что в условиях повышения концентрации хлорида натрия в среде в бактериальных клетках увеличивается концентрация плазмидной ДНК размером 2,7 т.п.н. Установлено, что бактерии, содержащие данную плазмиду, проявляют способность к росту в присутствии 20 % хлорида натрия.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные расширяют представление о биологии автохтонных и аллохтонных водных бактерий и могут быть использованы в мониторинге антропогенной нагрузки на природные экосистемы. Обоснована возможность использования выявленных маркерных признаков (психро- и галотолерантность, антибиотикочувствительность) для дифференциации автохтонных и аллохтонных бактерий.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Способность к росту при низкой ( $+5^{\circ}\text{C}$ ) температуре, а также устойчивость к высоким (5 и 10%) концентрациям хлорида натрия являются маркерными признаками автохтонных бактерий оз. Шира.

2. Аллохтонные бактерии, выделенные из оз. Шира, не растут при низкой температуре, относятся к группе негалофильных бактерий, характеризуются повышенной устойчивостью к антибиотикам (ампициллину, канамицину) и обнаруживаются в участках водной экосистемы, испытывающих наиболее сильное антропогенное воздействие.

3. В условиях повышения концентрации хлорида натрия в среде в бактериальных клетках увеличивается концентрация плазмидной ДНК размером 2,7 т.п.н. Бактерии, содержащие данную плазмиду, проявляют способность к росту в присутствии 20 % хлорида натрия.

**Апробация работы и публикации.** Основные результаты исследований доложены и обсуждены на Южно-Сибирской региональной научной конференции студентов и молодых ученых "Экология Южной Сибири – 2000 год", Абакан, 1997, 1998, 1999, 2000, 2001; Научно-практической конференции "Медико-биологические и экологические проблемы курортного комплекса

"Озеро Шира", посвященной 100-летию организации курорта, республика Хакасия, 1997; VIII Международной конференции «Новые направления биотехнологии», Москва, 1998; Международной конференции «Проблемы загрязнения окружающей среды», Москва, 1998; I Международной конференции "Биоразнообразие и динамика экосистем Северной Евразии", Новосибирск, 2000; I Международном рабочем совещании "Биоразнообразие и динамика экосистем Северной Евразии: информационные технологии и моделирование", Новосибирск, 2001; V Международной конференции "Проблемы загрязнения окружающей среды", Волгоград-Пермь, 2001; VIII Международной конференции по соленым озерам, республика Хакасия, 2002; XII Международной конференции молодых ученых «Биология внутренних вод: проблемы экологии и биоразнообразия», Москва, 2002; Межрегиональной конференции молодых ученых «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии», Пермь, 2002; Международном Байкальском микробиологическом симпозиуме «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ», Иркутск, 2003.

По теме диссертации опубликовано 24 печатных работы.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 148 страницах, содержит 29 рисунков и 3 таблицы. Список цитируемой работы включает 213 источников, из них 57 отечественных и 156 зарубежных авторов.

**Связь работы с научными программами.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Института биофизики СО РАН и является частью исследований, проводимых по теме «Биофизические основы функционирования природных экосистем (мониторинг, эксперименты, модели)» (индекс приоритетного направления 4.1.5.4.2.1, номер регистрации 01.960004916). Исследования выполнены при поддержке РФФИ (гранты N. 97-04-49988, N. 02-05-64096, N. 01-05-64615, № 02-05-06250 мас), Красноярского краевого фонда науки (гранты N. 8F0006, N. 10 F228M), ФЦП «Интеграция» (грант N. 73), ФЦП «Интеграция» (грант N. 162), Президиума РАН (грант N. 233).

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объектами исследования** служили бактериальные культуры, выделенные в разные сезоны из разных зон оз. Шира: центральной, курортной, зоны расположенной близ сельскохозяйственных полей и устья р. Сон. Вода оз. Шира - сульфатно-хлоридно-натриево-магниевая и содержит до 22 г/л растворенных солей. Соленость озера испытывает значительные колебания по глубине и по времени, увеличиваясь от 18 г/л у поверхности до 30 г/л в придонных слоях. В летний период в озере с учетом неравномерной минерализации воды по глубине образуется стратификация, близкая к двухслойной. На поверхности озера (эпилимнионе) температура воды 15-25<sup>0</sup>С, на глубине 6-8 м располагается зона термоклина, где температура воды

составляет 4 - 15°C, в придонном горизонте озера (гиполимнионе) – холодная вода (1,4-3°C).

**Условия культивирования.** Бактерии выращивали на агаризованной минимальной среде (Методы общей бактериологии, 1983), модифицированной нами добавлением пептона и включающей следующие компоненты (г/л): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 3, NaCl – 0,5, NH<sub>4</sub>Cl – 1, пептон – 5, агар-агар – 20. После автоклавирования стерильно добавляли 1 мл 20%-го раствора MgSO<sub>4</sub> и 1 мл 0,5%-го раствора CaCl<sub>2</sub>. Культивирование вели при температуре 5 или 25°C. Для выявления галотолерантных бактерий в среду добавляли 50,0 или 100,0 г/л хлорида натрия (Кашнер, 1978).

**Изучение морфологических признаков** клеток бактерий осуществляли при помощи микроскопа МБИ-15. Исследование систематической принадлежности бактерий проводили на основе морфологических, физиолого-биохимических характеристик (Методы общей бактериологии, 1983) в соответствии с «Определителем бактерий Берги» (под ред. Хоулт и др., 1997) на базе Красноярского Госсанэпиднадзора.

**Определение чувствительности к антибиотикам** у выделенных бактериальных культур осуществляли методом реплик (Егоров, 1979; Методы общей бактериологии, 1983) на агаризованной минимальной среде с пептоном с содержанием антибиотиков, различающихся механизмом действия: ингибиторы синтеза клеточной стенки (ампициллин, пенициллин и диклосациллин), ингибиторы синтеза белка (канамицин, эритромицин, тетрациклин, олететрин). Для проведения массового скрининга антибиотикочувствительности бактериальных изолятов из оз. Ши́ра выбраны ампициллин и канамицин, широко используемые в медицинской практике курортных комплексов «Озеро Ши́ра». Антибиотики добавляли в среду после автоклавирования в концентрации 50 мкг/мл.

**Выделение плазмидных ДНК** проводили методом щелочного лизиса (Маниатис, и др., 1984) на базе государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Бердск). Для определения размеров плазмид у исследуемых бактерий использовали плазмидные ДНК известных размеров: pVMB105 (5,6 т.п.н.), pBR322 (4,4 т.п.н.), λPst1. Электрофорез проводили в 0,8%-ом агарозном геле, используя трис-ацетатный буфер в концентрации 50 мМ, pH 7,5 (Маниатис и др., 1984). Анализ электрофореграмм проводили с помощью программного пакета Scion Image 4.0.2b для Windows 95. Исследование влияния изменения копийности плазмиды pSH1 2,7 т.п.н. на изменение порога галотолерантности бактериальных штаммов проводили при пассажах клеток, содержащих плазмиду pSH1, на агаризованную минимальную среду с пептоном и 0,05, 5, 10 и 20% NaCl.

**Периодическое культивирование** проводили на термостатированной качалке в пробирках объемом 50 мл (объем среды 20 мл) при температуре 28°C. При проведении экспериментов по исследованию способности к росту вариантов штамма *Micrococcus* sp. 9/pSH1 в условиях разной солености использовали минимальную среду с пептоном и 0,05, 5, 10 и 20% NaCl.

Для выявления катаболитной репрессии генов галотолерантности проводили культивирование плазмидсодержащего штамма *Micrococcus* sp.

9/pSH1 и бесплазмидного штамма *Pseudomonas* sp. 239 в минимальной среде с пептоном с разными концентрациями хлорида натрия (0,05, 5 и 10%) с добавлением глюкозы, а также глицерина. Глюкозу и глицерин добавляли после автоклавирования в виде 20%-ного раствора в количестве 10 мл/л. Оптическую плотность бактериальных суспензий измеряли на фотозлектроколориметре КФК-2 в 0,3 см кювете при длине волны 540 нм (зеленый фильтр).

**Совместная интродукция природного и трансгенного штаммов в модельные условия на основе природной солевой среды.** В экспериментах использовали *Escherichia coli* Z905/pPHL7 (ИБФ СО РАН), полученный, при трансформации штамма *E. coli* Z905 (*hsdR*<sup>+</sup>, *hsdM*<sup>+</sup>, *gal*<sup>+</sup>, *met*<sup>+</sup>, *supE*, *recA*, *tet*<sup>r</sup>) рекомбинантной плазмидой pPHL7 (*lux*<sup>+</sup>, *ap*<sup>r</sup>), содержащей гены бактериальной люминесцентной системы *Photobacterium leiognathi* ( $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы люциферазы и три гена комплекса редуктазы жирных кислот, необходимого для синтеза альдегида), клонированные в векторе pUC18 под контролем *lac*-промотора (Illarionov *et al.*, 1990), и *Micrococcus* sp. 9, содержащий природную плазмиду pSH1 (NaCl<sup>r</sup>) размером 2,7 т.п.н. Штамм *Micrococcus* sp. 9/pSH1 выделен нами в 1996 г. из поверхностного слоя эпиплимниона центральной зоны оз. Шира

**Подготовка модельных условий для совместной интродукции штаммов.** Воду, взятую с поверхности из центральной зоны оз. Шира, использовали в качестве природной солевой среды. Пробы воды дробно стерилизовали в стеклянных сосудах в течение 15 ч при температуре 70<sup>0</sup>С. После каждой стерилизации проводили анализ проб воды на остаточную микрофлору. Использовались сосуды общим объемом 450 мл, рабочий объем составлял 250 мл. Интродукцию штамма *E. coli* Z905/pPHL7, а также *Micrococcus* sp. 9/pSH1 в солевую среду осуществляли засевом из ночной культуры на среде M9 (Miller, 1972) с глицерином (стимулятором экспрессии свечения) в количестве 4·10<sup>5</sup> кл/мл.

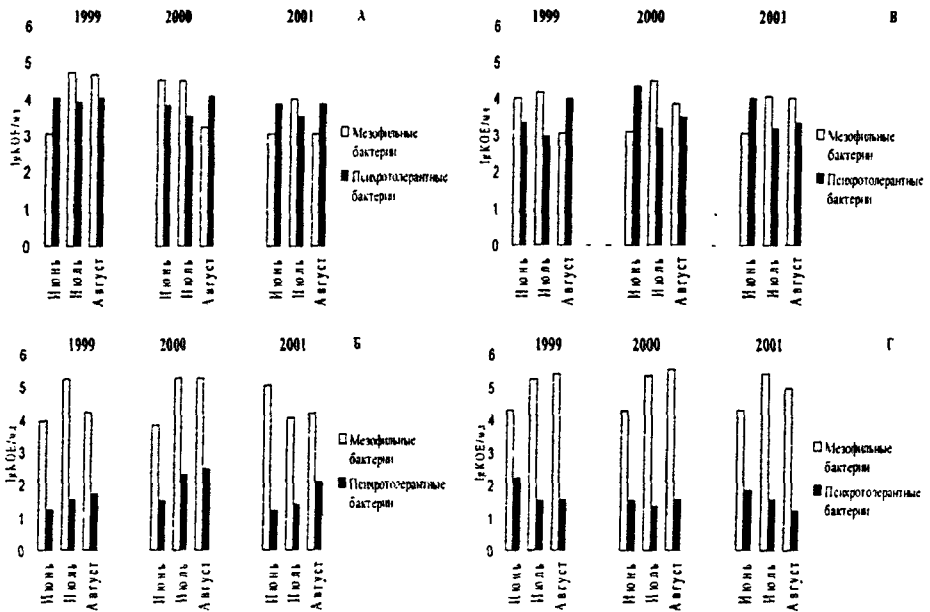
**Выделение трансформантов** проводили путем высевов (0,1 мл) воды из модельных условий на агаризованную среду M9 с пептоном и с добавлением ампициллина (50,0 мкг/мл) – селективного фактора для рекомбинантной плазмиды и хлорида натрия (100,0 г/л) в качестве селективного фактора для природной плазмиды.

**Статистическую обработку данных** проводили по стандартным методикам (Лакин, 1973) с использованием программного пакета Microsoft Excel 7.0 для Windows 95. Эксперименты проводили в трех повторностях. Для полученных данных рассчитывали среднее, среднее квадратическое отклонение и доверительный интервал. Все расчеты проводил с учетом уровня значимости  $\alpha=0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние естественных факторов на распределение автохтонных и аллохтонных бактерий в оз. Шира.**

Исследовано горизонтальное (по зонам) и вертикальное (по глубинам) распределение бактериальных культур в оз. Шира. В связи с тем, что в озере четко прослеживается температурная стратификация, при анализе проб воды на бактериальную микрофлору основное внимание уделялось двум группам бактерий: мезофильным и психротолерантным бактериям. Как видно из рис. 1, в летний период 1999-2001 гг. во всех исследуемых зонах оз. Шира присутствовали как мезофильные, так и психротолерантные бактерии, при этом доминирующее положение занимали мезофильные бактерии (рис. 1).



**Рис. 1. Распределение мезофильных и психротолерантных бактерий, выделенных из различных зон оз. Шира в летний период 1999, 2000 и 2001 гг.**

А – центральная зона (усредненные данные); Б – курортная зона; В – зона, располагающаяся близ сельскохозяйственных полей; Г – устье р. Сон.



Психротолерантные бактерии преобладали в центральной зоне озера (рис. 1; рис. 2) и зоне расположенной близ сельскохозяйственных полей. В курортной зоне, а также в устье р. Сон зарегистрирована наименьшая численность таких бактерий. Разница в количественном соотношении мезофильных и психротолерантных бактерий в исследуемых зонах озера может быть обусловлена, в первую очередь, различиями в значениях средних температур в этих участках. Так, например, на поверхности в центральной части оз. Шира температура воды составляла 18-22<sup>0</sup>С, здесь преобладали мезофильные бактерии (рис. 2), в металимнионе (10 м) температура не превышала 10,0-12,8<sup>0</sup>С, а в гипolimнионе 1,5-1,7<sup>0</sup>С. Именно на глубине 10 и 20 м в основном и были выделены психротолерантные бактерии (рис. 2). В курортной зоне температура воды достигала 23-25<sup>0</sup>С, что может способствовать развитию мезофильных бактерий.

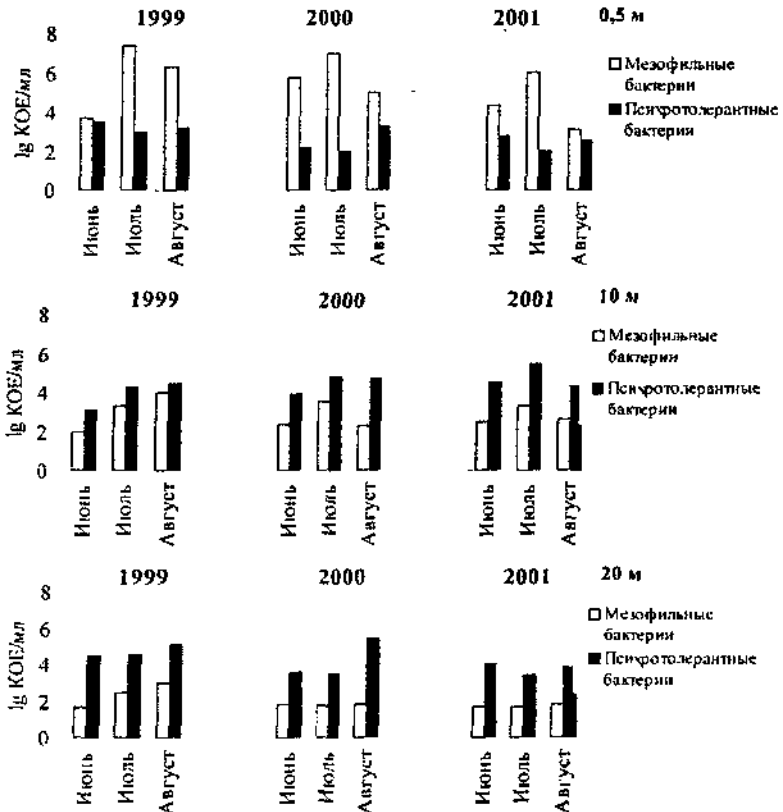


Рис. 2. Распределение мезофильных и психротолерантных бактерий, выделенных с различных глубин из центральной зоны оз. Шира в летний период 1999- 2001 гг.

Кроме того, преобладание мезофильных бактерий в воде вблизи курорта может быть связано с их поступлением в озеро со сточными водами курортных комплексов.

Следующий этап исследований был связан с оценкой способности к росту в присутствии высоких концентраций хлорида натрия мезофильных и психротолерантных бактерий. При этом кроме способности к выживанию при низких температурах, автохтонные бактерии должны проявлять определенную степень галотолерантности, что связано с обитанием в водоеме повышенной минерализации (до 30 г/л). Это свойство бактерий было использовано для их разделения на автохтонные и аллохтонные. Из данных, представленных на рис. 3, видно, что негалофильные бактерии присутствовали во всех четырех исследуемых зонах озера. В курортной зоне и устье р. Сон такие бактерии доминировали. Преобладание негалофильных бактерий в курортной зоне может быть в результате поступления стоков курортных комплексов, и, следовательно, снижения концентрации хлорида натрия в этой зоне (2,4 г/л NaCl).

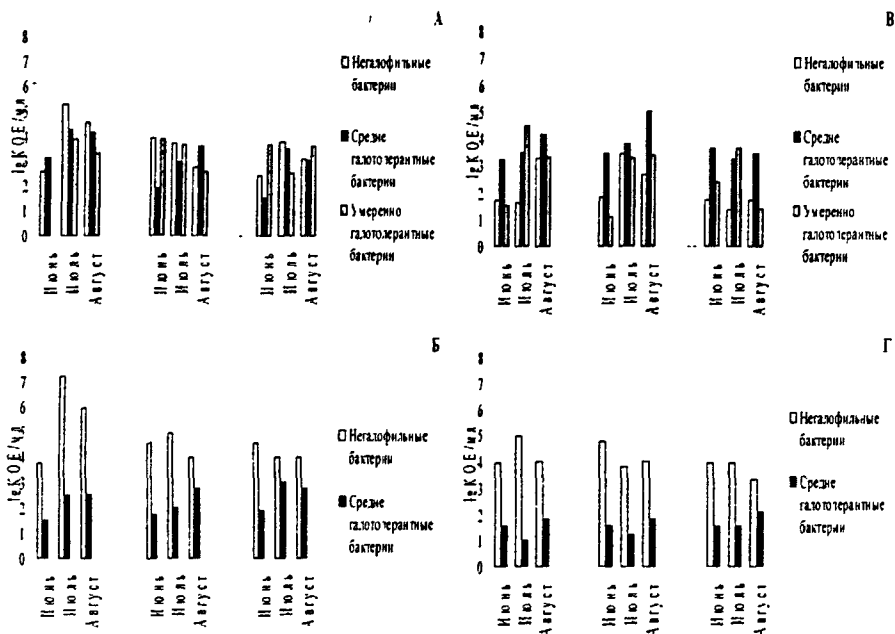


Рис. 3. Распределение негалофильных и галотолерантных бактерий, выделенных из различных зон оз. Ширы в летний период в 1999, 2000 и 2001 гг. А - центральная зона (усредненные данные); Б - курортная зона; В - зона, располагающаяся близ сельскохозяйственных полей; Г - устье р. Сон

В зоне устья р. Сон также отмечена низкая концентрации соли 0,6 г/л NaCl, поскольку впадение реки приводит опреснению этого участка озера (Парначев и Вишневский, 1997; Kalacheva *et al.*, 2001). В центральной зоне оз. Ши́ра негалофильные бактерии были выявлены в основном в поверхностном слое эпилимниона (рис. 4). На глубине 10 и 20 м численность негалофильных бактерий уменьшается. Здесь преобладают среднегалотолерантные и умеренно галотолерантные бактерии.

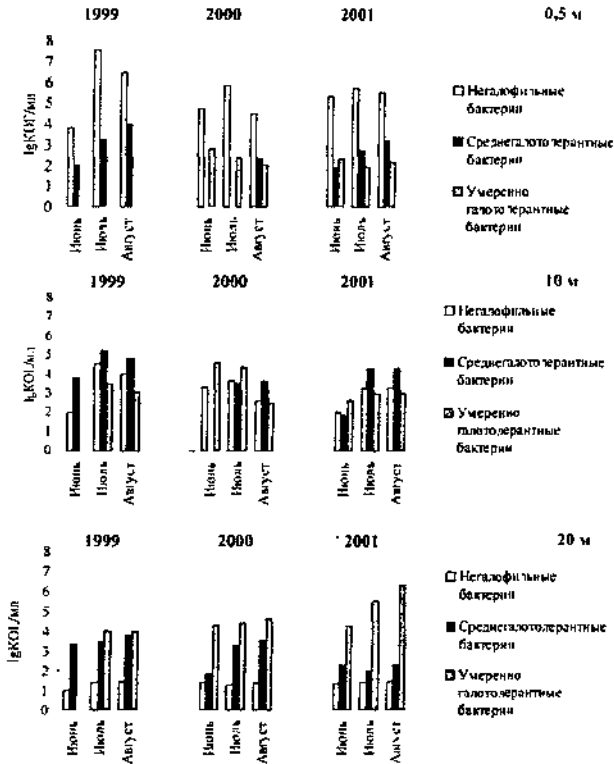


Рис. 4. Распределение негалофильных и галотолерантных бактерий, выделенных с различных глубин из центральной зоны оз. Ши́ра в летний период в 1999-2001 гг.

Исследование систематического положения бактерий растущих при низкой ( $5^{\circ}\text{C}$ ) температуре, а также выдерживающих высокие концентрации хлорида натрия показало, что такие бактерии относятся к родам *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Halococcus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. Важно отметить, что представители этих родов преобладают в центральной зоне оз. Ши́ра и, по-

видимому, являются автохтонными. Бактерии родов *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium* и *Enterobacter* не растут при низкой температуре и не способны к росту в присутствии высоких (5 или 10%) концентраций хлорида натрия. По-видимому, такие бактерии являются аллохтонными.

**Влияние антропогенных факторов на бактерии оз. Шира.** Присутствие аллохтонных бактерий в природных экосистемах может приводить к нежелательным явлениям, проявляющихся, прежде всего на свойствах автохтонных бактерий. Поскольку оз. Шира имеет антропогенные входы, содержащие аллохтонные бактерии, то представляется целесообразным исследовать возможное негативное влияние поступающих аллохтонных бактерий на свойства автохтонных бактерий. Для анализа возможности закрепления резистентности к антибиотикам у автохтонных бактерий оз. Шира представляет интерес центральная часть озера. Проведена оценка чувствительности к ампициллину и канамицину у автохтонных бактерий, выделенных в разные сезоны из центральной зоны оз. Шира в 1999 г. (рис. 5).

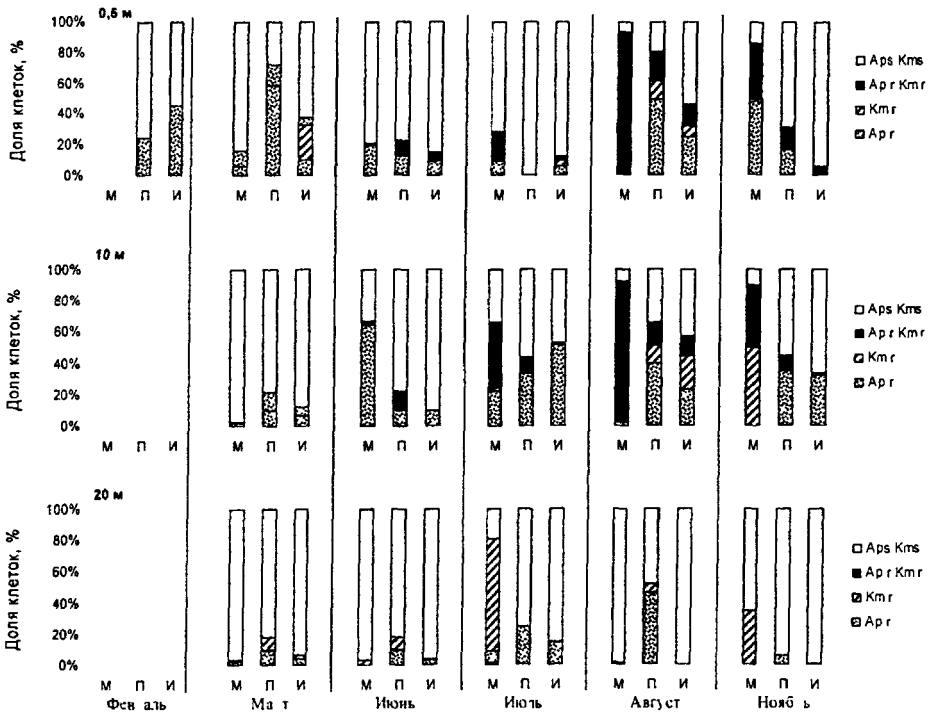


Рис. 5. Изменение доли антибиотикорезистентных мезофильных психротолерантных и термондуцируемых бактерий, выделенных в разные сезоны из центральной зоны оз. Шира в 1999 г.

М – мезофильные бактерии. П – психротолерантные бактерии, И – термондущуруемые бактерии. Ар<sup>Км</sup> – бактерии устойчивые к ампициллину и канамицину; Ар – бактерии устойчивые только к ампициллину; Км – бактерии устойчивые только к канамицину; Ар<sup>Км</sup> – бактерии чувствительные к антибиотикам.

Как видно из рис. 5, устойчивость к ампициллину и канамицину характерна в основном, для мезофильных бактерий. Проявление такой резистентности было отмечено с началом курортного сезона (июнь), которая, сохранялась вплоть до ноября. В холодный период (февраль, март) мезофильные бактерии не были обнаружены (рис. 5). В зимне-весенних пробах воды преобладали психротолерантные и термондущуруемые бактерии, чувствительные к антибиотикам. Устойчивость к ампициллину у этих групп бактерий составляла от 10 до 60%. В летние месяцы ампициллинрезистентность отмечалась у всех проанализированных групп бактерий, при этом резистентность к канамицину проявлялась у незначительного количества проанализированных бактериальных изолятов. В связи с тем, что присутствие в центральной зоне оз. Шира бактерий, устойчивых к ампициллину и канамицину отмечено во время активного функционирования курортных комплексов «Озеро Шира» (июнь-июль), проведено сравнительное исследование чувствительности к антибиотикам негаллофильных, среднегаллофильных и умеренно галлофильных бактерий, выделенных их курортной и центральной зон оз. Шира (рис. 6). Анализ антибиотикочувствительности бактерий по группам галлофильности обусловлен одной из основных причин. Она заключается в том, что в курортной зоне озера преобладают негаллофильные бактерии (рис. 3), которые по нашему мнению в большей части являются аллохтонными. В связи с этим, было сделано предположение, что проведение сравнительного анализа антибиотикочувствительности негаллофильных и галлофильных бактерий, выделенных из курортной и центральной зон озера, позволит выявить основных бактерий-носителей генов устойчивости к антибиотикам в оз. Шира, и, в частности, в центральной его зоне. Как видно из данных представленных на рис. 6, возрастание доли бактерий устойчивых к ампициллину и канамицину в курортной зоне оз. Шира сопровождалось возрастанием доли бактерий, проявляющих данный признак и в центральной зоне озера (рис. 6). Причем наиболее выраженная антибиотикорезистентность была характерна для негаллофильных бактерий, что отличало их от среднегаллофильных бактерий. На основании полученных результатов сделано предположение о негативном влиянии курорта.

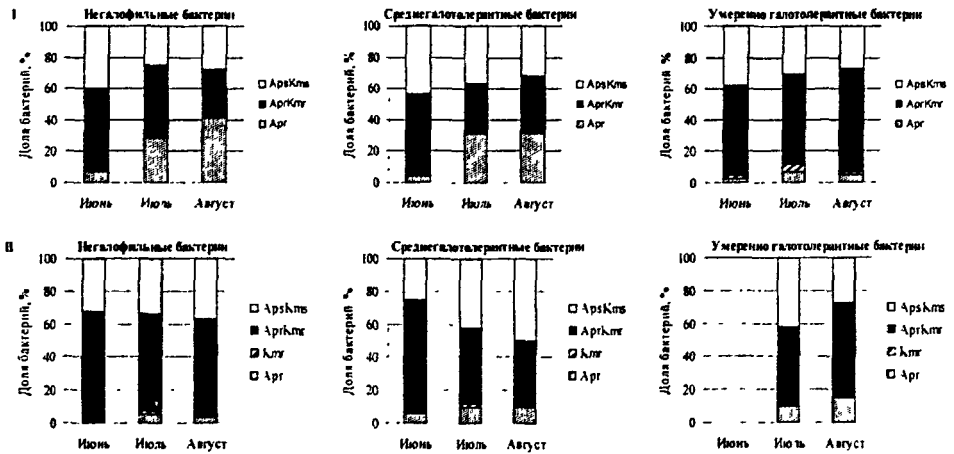


Рис. 6. Соотношение устойчивых и чувствительных к антибиотикам бактерий, выделенных из центральной и курортной зон оз. Ширы в летний период 1999-2001гг. (усредненные данные).

I – центральная зона озера, II – курортная зона озера. Ar<sup>r</sup>Km<sup>r</sup> – бактерии устойчивые к ампициллину и канамицину; Ar<sup>r</sup> – бактерии устойчивые только к ампициллину; Km<sup>r</sup> – бактерии устойчивые только к канамицину; Ar<sup>s</sup>Km<sup>s</sup> – бактерии чувствительные к антибиотикам.

**Возможные механизмы устойчивости бактерий из оз. Ширы к факторам среды.** За период с 1996 по 2001 гг. проанализировано 156 проб из различных зон оз. Ширы и проведена оценка чувствительности к антибиотикам около  $10^6$  бактерий. 344 антибиотикорезистентных бактериальных культур, исследованы на предмет присутствия в их клетках плазмидных ДНК. Оказалось, что 7% из проверенных бактериальных изолятов являлись носителями плазмид различного молекулярного веса (от 2,7 т.п.н до 12,7 т.п.н). Наибольшее количество плазмидсодержащих бактерий было выделено из курортной зоны оз. Ширы (табл. 1). Однако проведенные исследования по выявлению связи обнаруженных плазмид с устойчивостью бактерий к антибиотикам не позволили сделать однозначных выводов о возможной такой связи.

После хранения коллекции плазмидсодержащих бактерий на агаризованной минимальной среде с пептоном повторный анализ плазмид показал, что все ранее выделенные плазмидные ДНК сохранялись в клетках бактерий, а концентрация плазмиды размером 2,7 т.п.н. в клетках штаммов *Micrococcus* sp. 9, *Micrococcus* sp. 18, *Pseudomonas* sp. 10 и *Pseudomonas* sp. 14 существенно снижалась (рис. 9 А, дорожки 2, 3; рис. 9 Б, дорожки 1, 2; рис. 9 В, дорожки 1-4).

Таблица 1.

**Плазмидный профиль бактериальных изолятов, выделенных  
из оз. Шира**

Номер штамма	Зона наблюдения	Чувствительность к антибиотикам		Максимальная концентрация NaCl в (%), к которой устойчивы штаммы	Размеры плазмид (т.п.н.)
		Ap	Km		
4	Центр	+	-	5	11,5
9	Центр	-	+	10	2,7
10	Центр	+	+	10	2,7 10,6
13	Центр	+	+	5	11,5
14	Центр	+	+	10	2,7
18	Центр	-	+	10	2,7 10,6
19	Центр	-	-	0,05	12,5
22	Центр	+	+	5	12,5
137	Центр	+	+	5	11,5
164	Центр	+	-	20	Нет
239	Центр	+	+	20	Нет
106	Курорт	+	+	0,05	4,4; 5,6; 8,8; 11,5
116	Курорт	+	+	0,05	5,6; 8,8; 11,5
118	Курорт	+	+	5	3,7; 4,4; 5,6; 8,8; 11,5
125	Курорт	+	-	0,05	4,4; 5,6; 8,8; 11,5
167	Курорт	+	+	5	12,5
42	4000 м от курорта	+	+	0,05	12,5
43	4000 м от курорта	-	+	5	4,4; 5,6
49	4000 м от курорта	-	+	5	4,4; 5,6
241	3500 м от курорта	+	+	0,05	12,7
242	3500 м от курорта	+	+	0,05	12,7
244	3500 м от курорта	+	+	5	12,7
248	3500 м от курорта	+	-	5	12,7
250	3500 м от курорта			0,05	12,7

Поскольку оз. Шира относится к солоноватым озерам, в котором одними из доминирующих ионов являются  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , то мы предположили, что хлорид натрия может оказывать влияние на поддержание плазмиды размером 2,7 т.п.н., обозначенную нами как рSH1. Поскольку в штаммах *Pseudomonas* sp. 10 и *Micrococcus* sp. 18 обнаружено два типа плазмидных ДНК (табл. 1), то исследование изменения концентрации плазмиды рSH1 в присутствии различных концентраций хлорида натрия проводили на штаммах *Pseudomonas* sp. 14 и *Micrococcus* sp. 9. После периодического культивирования бактерий, содержащих плазмиду 2,7 т.п.н. в течение 18 часов, в жидкой минимальной среде с пептоном и с содержанием 5% NaCl, было обнаружено возрастание концентрации плазмидной ДНК (рис. 7 А. *Micrococcus* sp. 9, дорожка 4; рис. 7 Б, *Pseudomonas* sp. 14, дорожка 3).

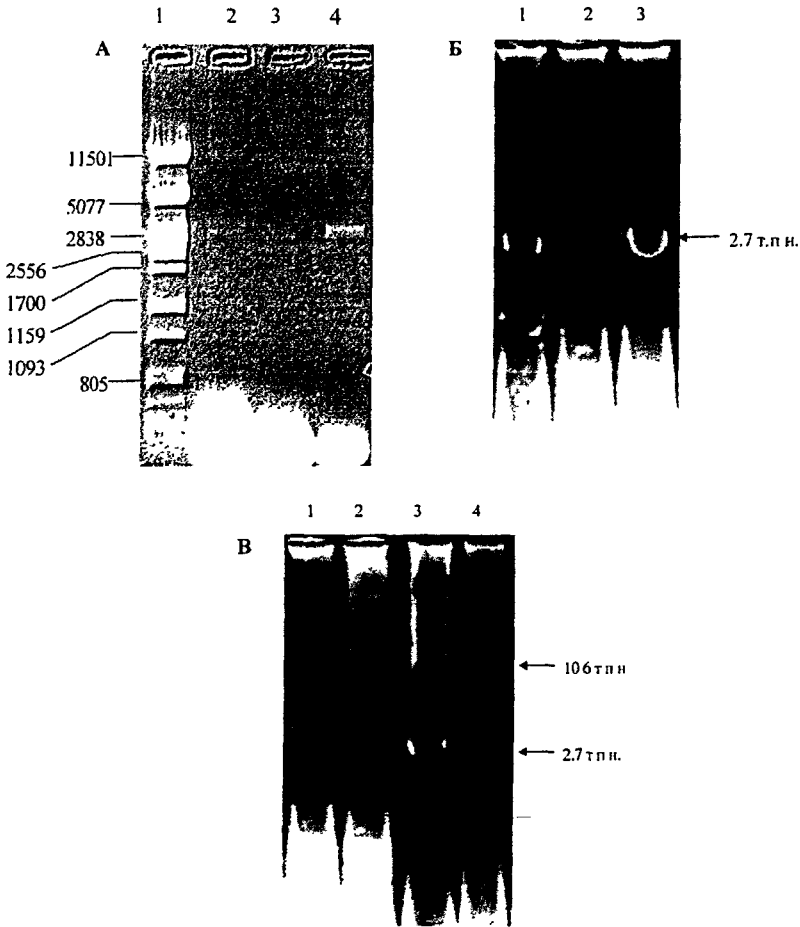


Рис. 7. Электрофоретический анализ плазмид штаммов, выделенных из оз.

**Шира.**

А - дорожки: 1 - контроль ( $\lambda$ Pst I), 2 - (*Micrococcus* sp 9), 3 - (*Micrococcus* sp. 9 после хранения на среде М9 с пептоном и 0,05% NaCl); 4 - (*Micrococcus* sp 9 после периодического культивирования в среде с 5% NaCl); Б - дорожки: 1 - (*Pseudomonas* sp. 14), 2 - (*Pseudomonas* sp. 14 после хранения на среде М9 с пептоном и 0,05% NaCl); 3 - (*Pseudomonas* sp. 14 после периодического культивирования в среде с 5% NaCl); В - дорожки: 1 - (*Pseudomonas* sp. 10), 2 - (*Pseudomonas* sp. 10 после хранения на среде М9 с пептоном и 0,05% NaCl); 3 - (*Micrococcus* sp. 18); 4 - (*Micrococcus* sp. 18 после хранения на среде М9 с пептоном и 0,05% NaCl).



Таким образом, показано, что хлорид натрия оказывает влияние на изменение концентрации плазмиды размером рSH1. В литературе известна плазида рSY10 размером 2,7 т.п.н., обнаруженная в клетках цианобактерий, копияность которой зависит от концентрации хлорида натрия (Takeyama *et al.*, 1991). Авторы отмечали, что при увеличении концентрации соли в среде от 0 до 3% возрастало и число копий плазмиды рSY10 размером 2,7 т.п.н. На примере штамма *Micrococcus* sp.9 (табл. 1, штамм N 9) были осуществлены серии пассажей на минимальной среде с пептоном и различными концентрациями хлорида натрия (рис. 8).

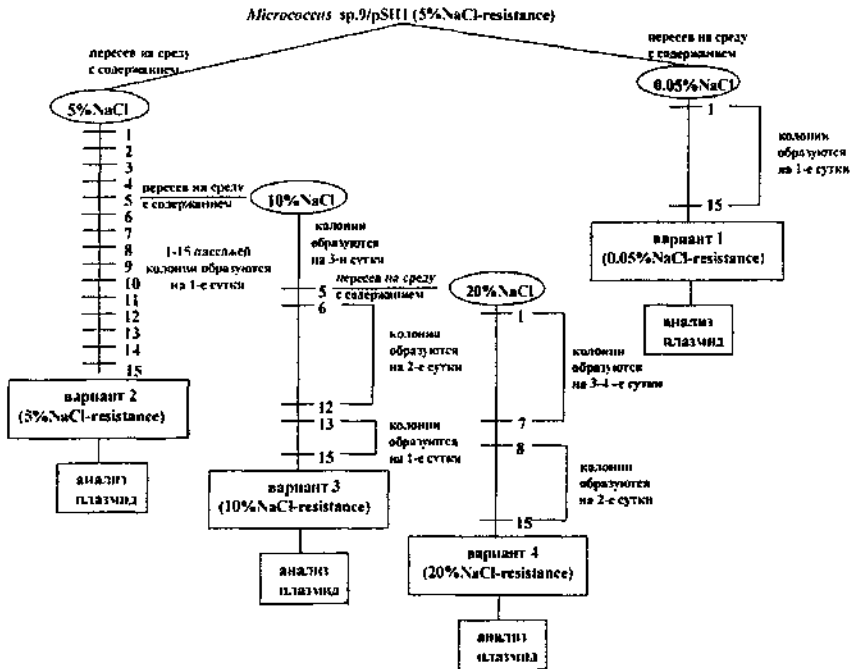


Рис. 8. Схема пассажей *Micrococcus* sp. 9/pSH1 на агаризованной среде с разными концентрациями хлорида натрия.

Проведенный электрофоретический анализ вариантов штамма *Micrococcus* sp. 9/pSH1, полученных после 15-ти пассажей в присутствии различных концентраций хлорида натрия, показал, что на среде с 0.05% NaCl концентрация плазмиды низкая, а по мере возрастания концентрации соли в среде возрастает и концентрация плазмиды (рис. 9). Наибольшее возрастание содержания плазмидной ДНК происходит в среде с концентрацией 5% NaCl (рис. 9, дорожка 2). При выделении плазмид из клеток варианта, полученного после 15-ти пассажей на среде с содержанием 20% NaCl, отмечался сильно затрудненный

лизис клеток. В связи с этим не удалось осуществить качественный электрофоретический анализ (данные электрофореза не приведены).

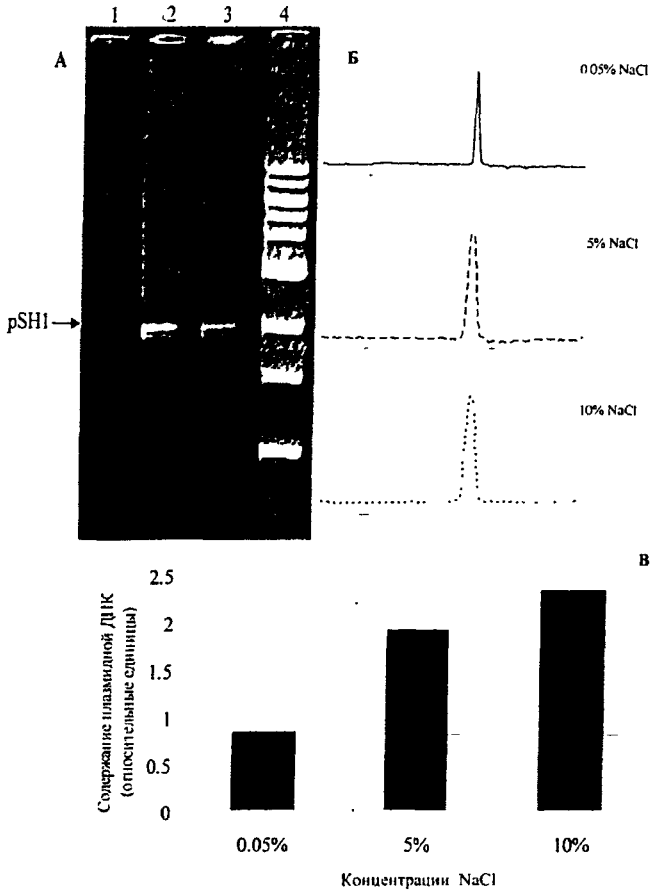


Рис. 9. Оценка концентрации плазмиды pSH1 штамма *Micrococcus* sp. 9 в среде с разными концентрациями NaCl.

А - электрофоретический анализ плазмиды pSH1 вариантов штамма *Micrococcus* sp. 9, выделенных после 15 пассажей на среде с разными концентрациями NaCl: дорожки: 1 - вариант 1 (устойчивость к 0.05% NaCl), 2 - вариант 2 (устойчивость к 5% NaCl), 3 - вариант 3 (устойчивость к 10% NaCl), 4 - контроль ( $\lambda$ Pst 1); Б - оценка концентрации плазмиды pSH1 с помощью программы Scion Image; В - сравнительный анализ содержания плазмиды pSH1 в среде с разными концентрациями NaCl.

При исследовании влияния различных концентраций хлорида натрия (0,05, 5, 10 и 20%) на рост вариантов штамма *Micrococcus* sp. 9/pSH1 показано, что варианты штамма различаются, способностью к росту в присутствии высоких концентраций соли (рис. 10). Различия в способностях каждого варианта расти в присутствии высоких концентраций хлорида натрия, можно объяснить, по-видимому, определенным их потенциалом резистентности к соли, полученным в результате пересевов.

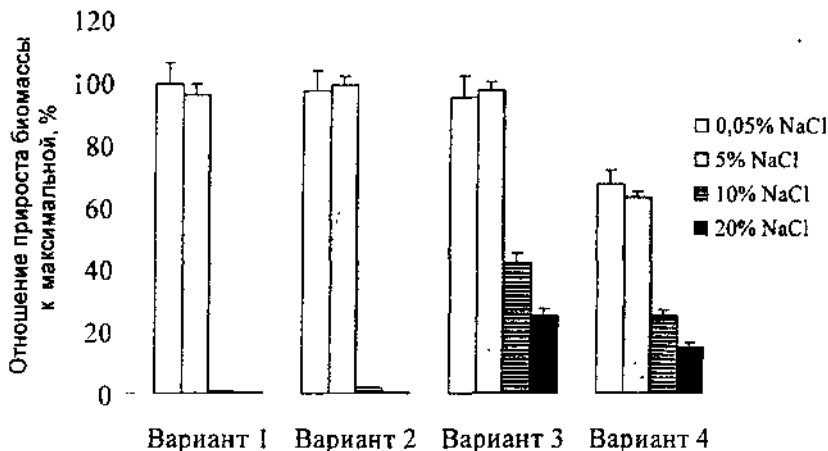


Рис. 10. Влияние хлорида натрия на рост вариантов штамма

*Micrococcus* sp. 9/pSH1 при периодическом культивировании.

Вариант 1 (полученный после 15-ти пассажей на среде с содержанием 0,05% NaCl); вариант 2 (полученный после 15-ти пассажей на среде с содержанием 5% NaCl); вариант 3 (полученный после 15-ти пассажей на среде с содержанием 10% NaCl); вариант 4 (полученный после 15-ти пассажей на среде с содержанием 20% NaCl).

Иллюстрация этого предположения наиболее характерна для варианта 3 (NaCl, 10%), который, в отличие от варианта 2 (NaCl, 5%) и, тем более, от варианта, полученного в результате пассажей на среде с 0,05% NaCl, демонстрирует рост в присутствии 10% NaCl и проявляет резистентность к 20% NaCl.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать предположение, что при возрастании концентрации хлорида натрия в среде культивирования штаммов, содержащих плазмиду pSH1, возрастающая концентрация плазмиды pSH1 2,7 т.п.н. способствует повышению порога галотолерантности у *Micrococcus* sp. 9, *Micrococcus* sp. 18, *Pseudomonas* sp. 10.

*Pseudomonas* sp. 14, и как следствие, их выживаемости в условиях высокого осмотического давления.

Относительно других выделенных природных плазмид (табл. 1) можно сказать, что их значение для бактерий оз. Шира пока остается неизвестным, хотя можно отметить высокую встречаемость плазмидных ДНК одного размера. Необходим поиск факторов, оказывающих влияние на изменение концентрации выделенных нами внехромосомных ДНК в клетках бактерий для определения функциональной значимости плазмид.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что автохтонные и аллохтонные бактерии, выделенные из оз. Шира, являются представителями родов *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Halococcus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*. Среди автохтонных бактерий доминируют представители *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Halococcus*, *Micrococcus* и *Pseudomonas*; среди аллохтонных бактерий - *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*.

2. Показано, что автохтонные бактерии характеризуются способностью к росту при низкой ( $5^{\circ}\text{C}$ ) температуре, а также в присутствии в среде 5 или 10% хлорида натрия. При этом среднегалотолерантные (5% NaCl) бактерии обнаруживаются во всех исследуемых зонах оз. Шира, умеренно галотолерантные (10% NaCl) бактерии преобладают на глубине 10 и 20 м в центральной зоне оз. Шира.

3. Обнаружено, что аллохтонные бактерии, выделенные из оз. Шира, не растут при низкой ( $5^{\circ}\text{C}$ ) температуре. относятся к группе негалофильных бактерий и обнаруживаются в участках водной экосистемы, испытывающих наиболее сильное антропогенное воздействие.

4. Выявлено, что в летний период в курортной и центральной зонах исследуемой экосистемы значительно возрастает доля бактерий, устойчивых к ампициллину и канамицину, тогда как в зимне-весенний период преобладают антибиотикочувствительные бактерии.

5. Обосновано, что поступление аллохтонных негалофильных бактерий в оз. Шира с хозяйственно-бытовыми стоками курортных комплексов способствует повышению доли бактерий с выраженной антибиотикорезистентностью в исследуемой водной экосистеме. Данный показатель может служить маркером негативного антропогенного воздействия на оз. Шира.

6. При исследовании плазмидного профиля бактерий, выделенных из оз. Шира, обнаружены плазмиды размером от 2,7 до 12,7 т.п.н. При этом не выявлена взаимосвязь между присутствием плазмидных ДНК и антибиотикорезистентностью плазмидсодержащих бактерий.

7. Впервые показано, что при увеличении концентрации хлорида натрия в среде в бактериальных клетках возрастает концентрация плазмиды рSH1 размером 2,7 т.п.н. Бактерии, содержащие плазмиду рSH1, проявляют способность к росту в присутствии 20% хлорида натрия.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Попова Л.Ю., Максимова Е.Е., Ермошенко Л.А., Крылова Т.Ю., Белявская В.А., Бояндин А.Н., Лобова Т.И., Печуркин Н.С. Рекомбинантные плазмиды как факторы риска и нарушения естественного биоразнообразия и функционирования природных экосистем//В сб.: Медико-биологические и экологические проблемы курортного комплекса озера Шира. – Томск, 1997. – С. 126-135.
2. Лобова Т.И. Изучение доминирующих групп микрофлоры озера Шира//Экология Сибири-2000 год: Тез. докл. Южно-Сибирской регион. науч. конф. студентов и молодых ученых. - Абакан, 1997. - С. 66.
3. Лобова Т.И., Крылова Т.Ю., Максимова Е.Е., Шитц Л.А. Сезонная динамика численности гетеротрофной микрофлоры озера Шира//Там же.- 1998. – С. 78.
4. Лобова Т.И. Изучение миграции рекомбинантной и природной плазмид между штаммами *Escherichia coli* Z905/pPHL7 и *Micrococcus* sp. 9/pSH1//Там же. - 1998. – С. 83.
5. Лобова Т.И. Сезонная динамика распространения множественной антибиотикорезистентности среди гетеротрофной микрофлоры озера Шира//Там же. - 1999. – С. 72.
3. Бояндин А.Н., Лобова Т.И., Максимова Е.Е., Попова Л.Ю., Печуркин Н.С. Экосистема озера Шира как модель, позволяющая оценить возможные последствия интродукции микроорганизмов в простые природные экосистемы//Труды VIII Междунар. конф. "Новые направления биотехнологии": Тез. докл. - Москва. 1998. - С. 105.
7. Popova L.Yu., Pechurkin N.S., Maksimova E.E., Kargatova T.V., Krylova T.Yu., Lobova T.I. Boyandin A.N. Experimental microcosms as models of natural ecosystems for monitoring survival of genetically modified microorganisms//Life Support and Biosphere Science. – 1999. – V. 6. – P. 193-197.
8. Lobova T., Boyandin A., Popova L. Natural and human impacts on plasmid fixture in the microbial link of Shira lake ecosystem//In: Biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia. Water ecosystems of North Eurasia. – Novosibirsk, 2000. – V. 5. Part 1. - P. 16-18.
9. Бояндин А.Н., Лобова Т.И., Крылова Т.Ю., Каргатова Т.В., Попова Л.Ю., Печуркин Н.С. Фактор солености и адаптационные возможности рекомбинантных микроорганизмов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*//Микробиология. - 2000. - Т. 69. N. 2. - С. 243-247.
10. Barchatov Yu.V., Lobova T.I. Mathematical modeling of anthropogenic and natural factors influence antibiotics resistance of heterotrophic bacteria in Shira lake//In: The first workshop on information technologies application to problems of biodiversity and dynamics of ecosystems in North Eurasia. – Novosibirsk, 2001. – P. 329.

11. Лобова Т.И., Максимова Е.Е., Попова Л.Ю. Мониторинг множественной устойчивости к антибиотикам гетеротрофных бактерий озера Шира//Труды V Междунар. конф. «Проблемы загрязнения окружающей среды»: Тез. докл. - Волгоград-Пермь, 2001.- С. 80.

12. Попова Л.Ю., Каргатова Т.В., Максимова Е.Е., Бояндин А.Н., Лобова Т.И., Крылова Т.Ю., Печуркин Н.С. Трансгенные микроорганизмы как антропогенный фактор в природных экосистемах//Там же. - С. 92.

13. Yu. Popova, T.I. Lobova, T.Yu. Krylova, T.V. Kargatova, E.E. Maksimova, A.N. Boyandin, N.S. Pechurkin. Population dynamics of transgenic microorganisms in the different microecosystem conditions//Advances in Space Research. - 2001. - V. 27. N. 9. - P. 1571-1579.

14. Бояндин А.Н., Лобова Т.И., Попова Л.Ю. Сохранение генетически модифицированного штамма *Escherichia coli* Z905/pPHL7 в стерильной воде из озера Шира//Труды VIII Междунар. конф. по соленым озерам: Тез. докл.. - Пос. Жемчужный, республика Хакасия. - 2002. - С. 130.

15. Лобова Т.И., Попова Л.Ю. Динамика проявления устойчивости к антибиотикам гетеротрофных бактерий озера Шира в период 1999-2001//Там же. - С. 138.

16. Бархатов Ю.В., Лобова Т.И., Попова Л.Ю. Теоретико-экспериментальный анализ влияния на экосистему озера Шира антропогенных и природных факторов по проявлению устойчивости к антибиотикам у гетеротрофных бактерий//Труды XII Междунар. конф. молодых ученых «Биология внутренних вод: проблемы экологии и биоразнообразия»: Тез. докл. - Борок, 2002. - С. 162-163.

17. Лобова Т.И. Проявление генетических маркеров у культивируемых бактерий озера Шира как показатель условий среды обитания//Труды Межрегиональной конф. молодых ученых «Современные проблемы экологии, микробиологии и иммунологии»: Тез. докл. - Пермь, 2002. - С. 54-55.

18. Lobova T.I., Maksimova E.E., Popova L.Yu., Pechurkin N.S. Geographical and seasonal distribution of multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria of Shira lake//Aquatic Ecology. - 2002. - V. 36. N. 2. - P. 299-307.

19. Lobova T.I., Barchatov Yu.V., Popova L.Yu. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in Shira lake: natural and anthropogenic impacts//Aquatic Microbial Ecology. - 2002. - V. 30. N. 1. - P. 11-18.

20. Бархатов Ю.В., Лобова Т.И., Саламатина О.В. Устойчивость к двум классам антибиотиков гетеротрофных бактерий литоральной зоны озера Шира//Труды Междунар. Байкальского микробиологического симпозиума «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ»: Тез. докл. - Иркутск, 2003. - С. 8-9.

21. Лобова Т.И. Свойства культивируемых бактерий озера Шира и выявление маркеров, используемых для индикации антропогенного воздействия на водные экосистемы//Там же. - С. 83-84.

22. Boyandin A.N., Lobova T.I., Popova L.Yu., Pechurkin N.S. Survival and alteration of the plasmid-containing microorganism *Escherichia coli* Z905/pPHL7 introduced into manmade closed aquatic microcosms//Advances in Space Research. - 2003. - V. 31. N. 7. - P. 1763-1768.

23. Лобова Т.И., Листова Л.В., Попова Л.Ю. Распределение гетеротрофных бактерий по акватории озера Шира //Микробиология. – 2003. – Т. 72. N. 6.

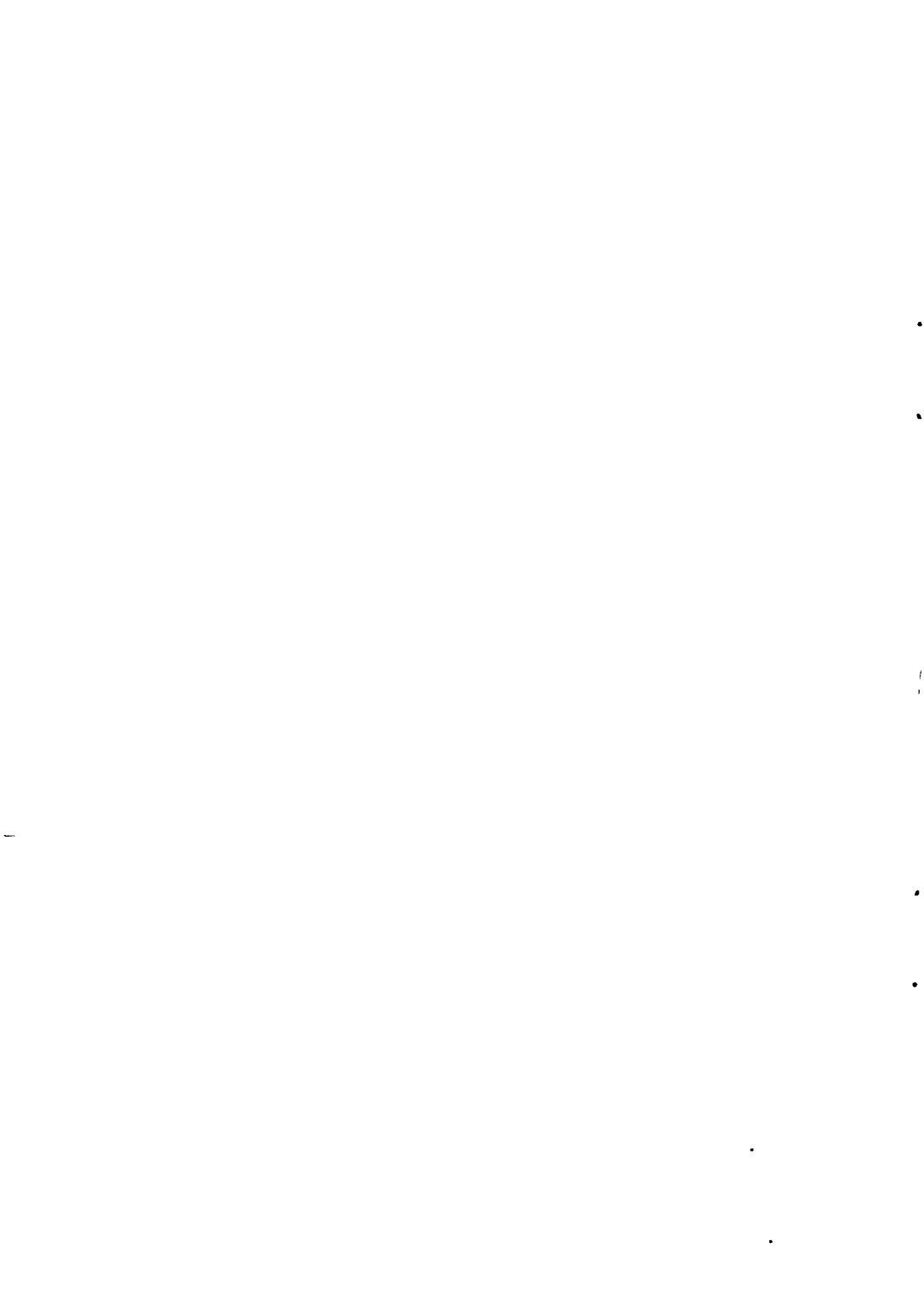
24. Лобова Т.И., Попова Л.Ю., Загребельный С.Н. Молекулярно-генетический подход к исследованию процессов распространения плазмид в природных микробных популяциях//Сибирский Экологический Журнал. - 2003.

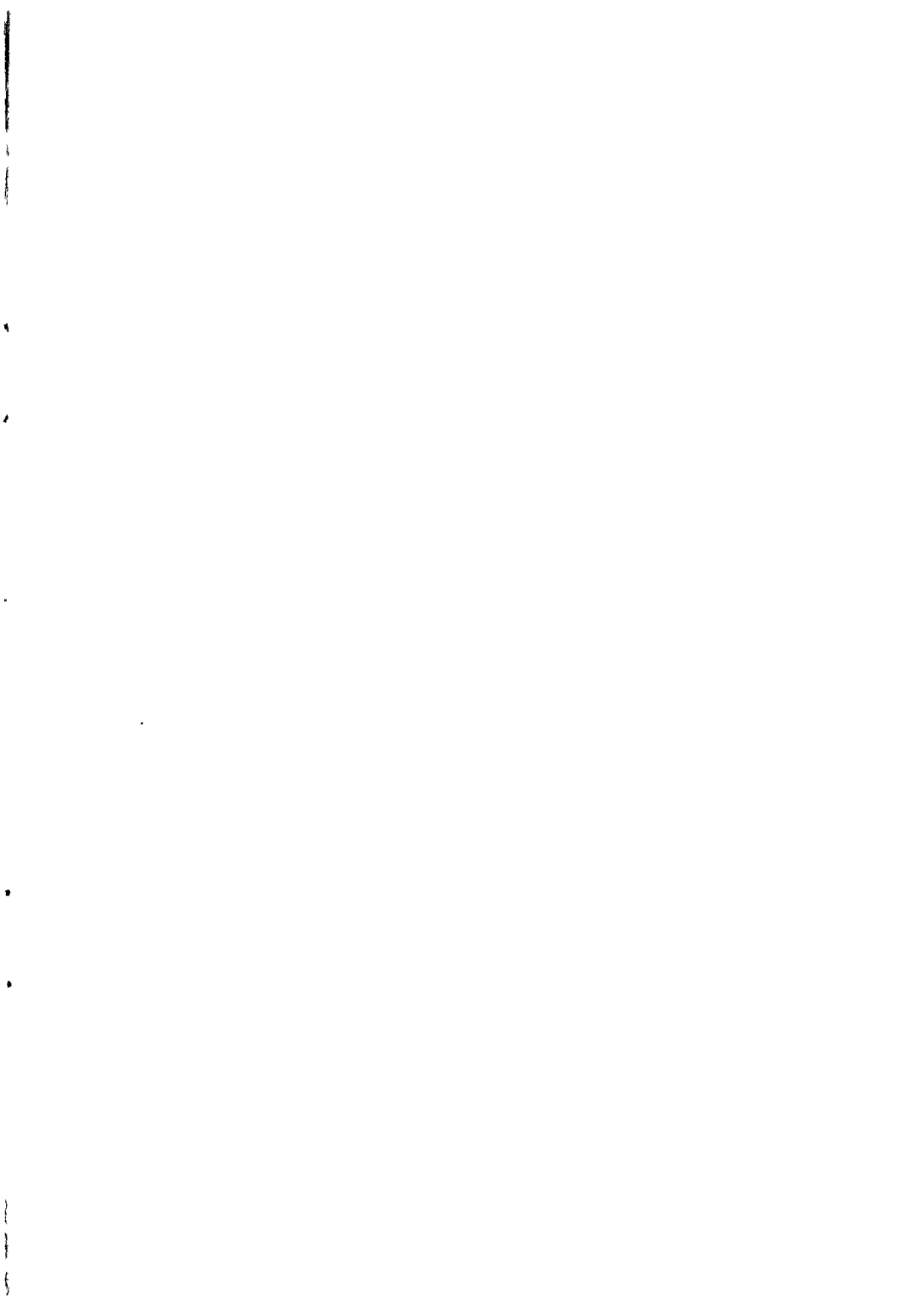


Подписано в печать 29.10.03.  
Формат бумаги 60x84 1/16  
Усл. печ. л. 2,0  
Тираж 100 экз. Заказ 964

---

Отпечатано на ризографе КГТУ  
660074, Красноярск, Киренского 26





2003-A

18240

牌 18240