



УДК 579.68:577.2.08

Характеристика состава микробных сообществ и оценка качества вод с помощью системы праймеров разного уровня специфичности

Н. Л. Белькова^{1,2}, Е. Б. Матюгина³, Е. В. Дзюба¹, Н. Н. Деникина¹,
Е. В. Суханова¹, М. П. Белых²

¹Лимнологический институт СО РАН, Иркутск

²Иркутский государственный университет, Иркутск

³Институт природных ресурсов, экологии и криологии СО РАН, Чита

E-mail: belkova@lin.irk.ru

Аннотация. Комплексный анализ гетеротрофного микробного сообщества в разных лимнических зонах оз. Арахлей в Забайкальском крае в период ранневесенней и летней стратификации позволил установить трофическую устойчивость и основную роль доминирующих гетеротрофов. Показано, что в водоёме в период перехода от гомотермии к стратификации минорные формы находятся в некультивируемом состоянии и не участвуют в основных метаболических циклах. По результатам молекулярно-генетического анализа состава микробных сообществ с помощью системы праймеров разного уровня специфичности и культивирования на селективных питательных средах определён спектр индикаторных гетеротрофных микроорганизмов для оценки качества вод оз. Арахлей.

Ключевые слова: качество воды, гетеротрофные микроорганизмы, оз. Арахлей, молекулярно-генетический анализ, система праймеров.

Введение

Микробные сообщества в водных экосистемах, непосредственно участвуя в формировании химического состава воды [12], определяют степень её пригодности для использования человеком. Сложность взаимосвязей в водных микробных сообществах, изменчивость их структуры и её зависимость от сезонных и физико-химических параметров, растущая антропогенная нагрузка на водоёмы обуславливают необходимость совершенствования системы микробиологического мониторинга пресноводных экосистем [8; 21]. В настоящее время актуальной является задача создания современной методологической основы программы мониторинга, которая позволит не только детектировать в тестируемых объектах патогенные и условно-патогенные бактерии, но и проводить комплексную диагностику состояния пресноводных микробных сообществ с целью определения степени потенциальной опасности этой среды для здоровья человека [6; 9].

Развивающаяся быстрыми темпами молекулярная микробиология доказала эффективность использования молекулярных диагностических признаков для детекции организмов.

Это позволяет вывести идентификацию из сферы научной деятельности систематиков и разработать рутинные аналитические процедуры, позволяющие легко и быстро проводить видовое определение или характеристику флотипа [17; 21]. Методы детекции микроорганизмов на основе видо- и групп-специфичной полимеразной цепной реакции имеют ряд преимуществ перед классическими микробиологическими методами [24] и могут стать основой микробиологического мониторинга нового поколения [6]. Они требуют меньше времени и эффективны в детекции как конкретных штаммов бактерий, так и отдельных таксонов разного филогенетического уровня.

Молекулярно-генетические исследования микробных сообществ активно проводятся в настоящее время в разных пресноводных экосистемах, в том числе в Восточной Сибири и Забайкалье [1; 2]. Система Ивано-Арахлейских озёр – одна из крупнейших озёрных систем Забайкалья, расположенная на водоразделе Ленского и Ангаро-Енисейского бассейнов. Наибольшим по площади (5900 га) является оз. Арахлей с максимальной глубиной 17,0 м. Для водоёма характерны внутригодовые колебания температуры воды от 0,5 до 25,2 °С, длитель-

ное стояние ледового покрова, прямая стратификация в летний и обратная в подлёдный период. Своеобразием годового термического цикла озера является инициированный проникающей солнечной радиацией ранний нагрев водных масс в подлёдный период, несмотря на большую толщину ледового покрова и низкую температуру воздуха. Концентрация растворенного кислорода в течение годового цикла в воде озера колеблется от 5,5 до 16,5 мгО₂/л (53,0–123,8 % насыщения) с максимальными значениями в зимний период, что обусловлено подлёдной вегетацией всех форм растительности. По ионному составу озёрные воды гидрокарбонатные, сульфатно-гидрокарбонатные, магниевые-кальциевые, натриево-магниевые-кальциевые. В целом озеро относится к мезотрофному типу, однако в зависимости от периода водности и сезона года в нём могут быть выделены олиготрофные и эвтрофные участки. По гидробиологическим, гидрохимическим и санитарно-эпидемиологическим показателям водоём относится к экологически стабильным [3; 4; 11]. Таким образом, оз. Арахлей является идеальной моделью для разработки и апробации системы детекции разных таксономических групп микроорганизмов на основе методов амплификации специфических фрагментов нуклеиновых кислот.

Целью настоящего исследования стала характеристика гетеротрофного микробного сообщества в разных лимнических зонах оз. Арахлей в период ранневесенней и летней стратификации с использованием молекулярно-генетических и микробиологических методов.

Материалы и методы

Для исследования разнообразия гетеротрофного сообщества микроорганизмов в апреле и августе 2009 г. с центральной станции озера (N 52°12,358', E 112°52,041') были отобраны пробы из разных лимнических зон: поверхностного слоя (2,0 м); слоя термоклина (14,0 и 10,0 м, соответственно) и придонного (14,5 м). Воду отбирали в стерильные ёмкости в трёхкратной повторности батометром Молчанова, транспортировали и хранили при температуре 4 °С. Для культивирования доминирующих микроорганизмов посе́вы проводили через сутки, наноформы бактерий детектировали в фильтрате, для чего 50 мл природной воды фильтровали через 0,22-микронные фильтры (Millipore) в стерильные пробирки. Гетеротрофные бактерии культивировали на модифицированном рыбо-пептонном агаре (РПАм: на

1 л питательной среды гидролизат кильки (Дагестанский завод питательных сред) 2 г; дрожжевой экстракт 1 г; глюкоза 1 г; агар 15 г, pH 7). Для стандартизации метода использовали питательную среду PCA, традиционно используемую в мировой практике для учёта гетеротрофных бактерий (PCA, Plate Count Agar, «Дифко») [14; 20; 25]. Инкубирование проводили при температуре *in situ*. На 3–4 сут. культивирования учитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Для изоляции делали стандартные пересевы из отдельно выросших колоний на 3 сут., чистоту культуры проверяли несколькими способами: визуальным, микроскопическим контролем и высевом на ряд питательных сред. Набор сред и их состав для дальнейшего культивирования бактерий определяли особенностями метаболизма изолированных микроорганизмов, а также их возможных спутников. После получения достоверных результатов с помощью светового микроскопа (Микмед Р-13-2, Россия) делали фенотипическое описание колоний и клеток при увеличении ×80 и ×2000 соответственно.

Анализ состава микробных сообществ из разных лимнических зон и идентификацию чистых культур проводили с использованием молекулярно-генетического анализа фрагментов рибосомных генов (16S рДНК). Природные пробы воды концентрировали фильтрованием на 0,22-микронных фильтрах (Millipore). Выделение ДНК изолированных штаммов проводили из суточных культур микроорганизмов. Нуклеиновые кислоты выделяли методом ферментативного лизиса с фенол-хлороформной экстракцией, используя коммерческие наборы ДНК-сорб и РИБО-сорб (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) [1]. Амплификацию препаратов ДНК чистых культур вели на бактериальных праймерах 27L–1492R, ампликоны анализировали в агарозном геле, элюировали методом замораживания-оттаивания [2]. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе ABI310A (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer) в Новосибирском приборном центре коллективного пользования СО РАН. Сравнительный анализ полученных результатов проводили с помощью пакета программ FASTA [25]. Состав микробных сообществ анализировали с помощью амплификации на парах праймеров с разным уровнем специфичности. Детектировали представителей царства Archaea с помощью пар праймеров ARCH1 и ARCH2, царства Eubacteria – EUB; основные эубактерии

альные филы: Cyanobacteria – CYA, Actinobacteria – ACT, Firmicutes – BLS, Planctomycetes – PLA, Bacteroidetes – CF, Spirochaetes – SCH; классы Betaproteobacteria – BET1 и BET2, Alphaproteobacteria – ALF, Alpha- и Deltaproteobacteria – ADF; кроме того, использовали видоспецифичные пары на виды: *Bacillus licheniformis* – Bac, *Aeromonas hydrophila* – AH, *Pseudomonas anguilliseptica* – PA [2].

Результаты и обсуждение

Для исследования разнообразия культивируемых гетеротрофных микроорганизмов оз. Арахлей проведены посевы на селективные питательные среды. Экспериментально установлено, что в течение суток после отбора в водных пробах культивируются в основном доминирующие формы, минорные же переходят в некультивируемое состояние.

Численность культивируемых гетеротрофных микроорганизмов, определённая методом предельных разведений, варьирует в разных зонах озера от 1–2 до 64 КОЕ/мл. Максимальные значения определены в весенний период в придонном слое (23–56 КОЕ/мл), а в летний – в зоне термоклина (64 КОЕ/мл) (табл. 1, 2). Этот метод даёт возможность определить только число жизнеспособных клеток в микробной популяции. Близкие значения, полученные в первом и во втором разведении в поверхностных водах в весенний период (см. табл. 1), и в поверхностных и придонных – в летний, по-видимому, свидетельствуют о трофической устойчивости доминирующего микробного сообщества этих лимнических зон к внешним изменениям.

Таблица 1

Характеристики роста культивируемых на разных селективных питательных средах микроорганизмов из проб воды, отобранных в различных лимнических зонах оз. Арахлей в апреле 2009 г.

Горизонт, м	РСА*		РПАм	
	Разведение	КОЕ/мл	Разведение	КОЕ/мл
Поверхностный слой, 2,0	10 ⁴	0	10 ⁴	0
	10 ³	1±2	10 ³	1±2
	10 ²	10±3	10 ²	9±2
	10 ¹	11±2	10 ¹	9±4
	фильтрат	0	фильтрат	0
Слой термоклина, 14,0	10 ⁴	0	10 ⁴	1±2
	10 ³	0	10 ³	1±1
	10 ²	7±2	10 ²	5±3
	10 ¹	22±4	10 ¹	10±2
	фильтрат	0	фильтрат	0
Придонный слой, 14,5	10 ⁴	2±1	10 ⁴	0
	10 ³	1±1	10 ³	0
	10 ²	6±3	10 ²	4±3
	10 ¹	50±6	10 ¹	23±5
	фильтрат	0	фильтрат	0

Примечание: * РСА – Plate Count Agar; РПАм – рыбопептонный агар модифицированная среда.

Таблица 2

Характеристики роста культивируемых на разных селективных питательных средах микроорганизмов из проб воды, отобранных в различных лимнических зонах оз. Арахлей в августе 2009 г.

Горизонт, м	Фильтрованная вода		Нефильтрованная вода	
	РСА*		РПАм	
	Разведение	КОЕ/мл	Разведение	КОЕ/мл
Поверхностный слой, 2,0	10 ³	0	10 ³	1±1
	10 ²	2±2	10 ²	6±4
	10 ¹	4±3	10 ¹	7±2
Слой термоклина, 14,0	10 ³	1±1	10 ³	2±1
	10 ²	3±2	10 ²	5±4
	10 ¹	1±1	10 ¹	64±17
Придонный слой, 14,5	10 ³	2±1	10 ³	7±3
	10 ²	1±2	10 ²	11±4
	10 ¹	4±2	10 ¹	13±1

Известно, что бактериальные клетки в естественных условиях обитания переходят в некультивируемое состояние в ответ на такие формы природного стресса, как голодание, рост вне рамок температурного оптимума и освещенности, повышенные осмотические концентрации, низкие концентрации кислорода [23], а также воздействие экзометаболитов синне-зелёных [10] и зелёных водорослей [7]. Ключевым фактором, способствующим обратному процессу – реверсии – является отмена неблагоприятных воздействий на клетки. Культивирование в лабораторных условиях традиционно рассматривают как фактор стресса для олиготрофных бактерий, но для резистентных форм гетеротрофов – это фактор реверсии к нормальной жизнедеятельности. Следует отметить, что некультивируемые формы бактерий характеризуются низкой метаболической активностью и малыми размерами (наноформы), оставаясь в фильтрате после фильтрации через бактериальный 0,22-микронный фильтр [22]. Отсутствие бактериального роста из фильтрата в весенний период во всех лимнических зонах озера свидетельствует о некультивируемом состоянии наноформ, когда для их роста и размножения требуется не только время, но и дополнительные стимулирующие факторы. По-видимому, минорные формы, находясь в водоёме в период перехода от гомотермии к стратификации в некультивируемом состоянии, не участвуют в основных метаболических циклах, и основная роль в природном микробном сообществе принадлежит доминирующим гетеротрофам. Изоляция бактерий из фильтрата в период летней стратификации водоёма свидетельствует об активном метаболическом состоянии сообществ в целом. К наноформам бактерий в данном случае относятся как медленно растущие, так и некультивируемые гетеротрофы.

Всего изолированы 125 штаммов микроорганизмов, из них для молекулярно-генетического анализа отобраны 33 наиболее характерных и доминирующих морфотипа (табл. 3). Разнообразие культивируемых гетеротрофных бактерий, выделенных из разных лимнических зон озера, составляют типичные представители фил *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* и *Firmicutes*. Нами

идентифицированы представители родов: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Janthinobacterium*, *Massilia*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* и *Sphingomonas*. Охарактеризованные нами микроорганизмы преимущественно имеют максимальную гомологию с не идентифицированными до вида штаммами. Видовая принадлежность определена только для некоторых представителей родов *Aeromonas* (*A. sobria* и *A. veronii*) и *Microbacterium* (*M. oxydans* и *M. foliorum*). Интересно отметить, что в качестве наноформ в период летней стратификации водоёма определены грамтрицательные палочки рода *Acinetobacter*. Представители этого рода отмечены как в нефильтрированной воде, так и в фильтрате (см. табл. 3).

После подлédной гомотермии, в последний сезон биологической подлédной весны, в оз. Арахлей устанавливается стратификация, и выделяются три основные значимые для активных микробных процессов лимнические зоны: кислородная фотическая зона эпилимниона, металимнион или зона термоклина и гиполимнион, в том числе поверхностный слой донных отложений. Две последние зоны характеризуются микроаэрофильными и, в некоторые периоды, кратковременными анаэробными условиями. Для экосистемы озера поздневесенний период является переходным и критическим, так как именно после весенней гомотермии происходит нарушение трофических связей, а значит, и основных метаболических путей в микробном сообществе. Поэтому ключевую роль играют доминирующие по численности виды. Состав бактериальных популяций зон термоклина и гиполимниона существенно отличается от такового в фотической зоне эпилимниона большей представленностью царств и основных фил бактерий (см. рис.). Отсутствие ампликонов на ДНК из проб воды кислородной зоны, детектирующих преимущественно микроаэрофильные и анаэробные микроорганизмы из царства архей (ARCH1, ARCH2) и классов альфа и дельтапротеобактерий (ADF), свидетельствует о начале процесса стратификации водоёма.

Таблица 3

Молекулярно-генетическая идентификация гетеротрофных бактерий из проб воды, отобранных в различных лимнических зонах оз. Арахлей в апреле и августе 2009 г.

Название культуры	Среда, разведение	Ближайший родственник из базы данных (гомология, %)
Апрель		
Поверхность – до 2,0 м		
EP-1	РПАм*, 1000	<i>Bacillus</i> sp. (99,5)
EC-1b	РСА, 1000	<i>Arthrobacter</i> sp. (97,6)
EC-1zh	РСА, 1000	<i>Arthrobacter</i> sp. (98,2)
EC-2	РСА, 1000	<i>Flavobacterium</i> sp. (99,4)
EC-3	РСА, 100	<i>Flavobacterium</i> sp. (99,6)
EC-2-2	РСА, 1000	<i>Dietzia</i> sp. (100)
EC-2.1.1	РСА, 1000	<i>Shingomonas</i> sp. (96,0)
EC-2-3	РСА, 1000	<i>Microbacterium oxydans</i> (99,6)
EP-19	РПАм, 1000	<i>Microbacterium</i> sp. (100)
EC-19	РСА, 1000	<i>Microbacterium foliorum</i> (99,9)
Термоклин – 14,0 м		
EC-7	РСА, 100	<i>Massilia</i> sp. (99,7)
EC-17-1-1	РСА, 100	<i>Staphylococcus</i> sp. (100)
EC-17-2	РСА, 100	<i>Staphylococcus</i> sp. (99,8)
EC-5	РСА, 1000	<i>Serratia</i> sp. (99,9)
EP-8	РПАм, 1000	<i>Rhodococcus</i> sp. (99,1)
EC-17-1	РСА, 100	<i>Aeromonas sobria</i> (100)
EC-18	РСА, 1000	<i>Aeromonas</i> sp. (98,5)
EC-8	РСА, 100	<i>Aeromonas veronii</i> (99,5)
EP-5	РПАм, 1000	<i>Aeromonas sobria</i> (98,9)
EP-6	РПАм, 1000	<i>Flavobacterium</i> sp. (99,6)
Придонный слой – 14,5 м		
EP-14	РПАм, 1000	<i>Aeromonas veronii</i> (94,4)
EP-9	РПАм, 1000	<i>Aeromonas sobria</i> (98,1)
EC-15	РСА, 100	<i>Flavobacterium</i> sp. (99,6)
EP-12	РПАм, 1000	<i>Flavobacterium</i> sp. (99,8)
Август		
Нефильтрованная вода		
AP-15	РСА, 1000	<i>Serratia–Araucicola</i> sp. (97,6)
AP-23	РСА, 1000	<i>Pseudomonas</i> sp. (99,7)
AP-26	РСА, 1000	<i>Janthinobacterium</i> sp. (99,9)
AP-42	РСА, 1000	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (100)
AP-49	РСА, 1000	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (99,6)
AP-62 см1	РСА, 1000	<i>Acinetobacter</i> sp. (99,2)
AP-62 см2	РСА, 1000	<i>Acinetobacter</i> sp. (98,2)
Фильтрат		
AP-64	РСА, 1000	<i>Acinetobacter</i> sp. (100 %)
AP-65	РСА, 1000	<i>Acinetobacter</i> sp. (99,7 %)

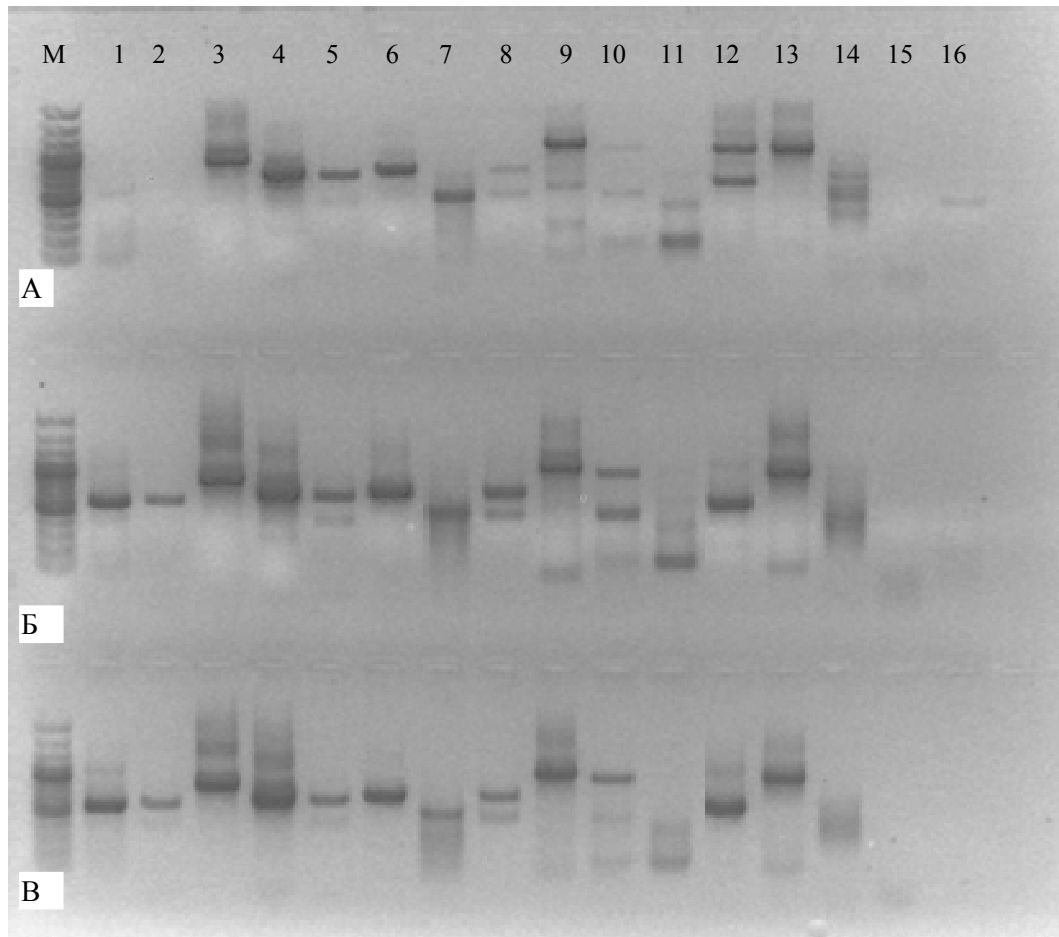


Рис. Электрофоретический анализ ампликонов на парах групп и видо-специфичных праймеров, полученных с суммарной ДНК, выделенных из проб воды с глубин 2 (А), 14,0 (Б) и 14,5 (В) м из оз. Арахлей, апрель, 2009 г. М – маркер молекулярного веса, 1 – ARCH1, 2 – ARCH2, 3 – EUB, 4 – CYA, 5 – BET1, 6 – BET2, 7 ALF, 8 – ADF, 9 – ACT, 10 – BLS, 11 – Bac, 12 – PLA, 13 – CF, 14 – SCH, 15 – AH, 16 – PA

Озеро Арахлей имеет важное рыбохозяйственное и рекреационное значение для Забайкальского региона. Среди факторов, оказывающих отрицательное влияние на рыбохозяйственную значимость Ивано-Арахлейских озёр, прежде всего следует отметить резкое усиление рекреационной нагрузки с 90-х гг. XX в. [5]. Среди культивируемых водных гетеротрофов нами отмечены микроорганизмы, детекция которых может быть важной для оценки ветеринарно-санитарного и санитарно-бактериологического состояния водоёма: бактерии родов *Aeromonas*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* (изолированные чистые культуры) и *Pseudomonas anguilliseptica* (получен на видо-специфичной амплификации) (см. табл. 3, и рис.). Все эти микроорганизмы являются широко распространёнными эвригалными эвритермными бактериями. В основном это сапрофиты, однако при определённых условиях они

могут становиться патогенными как для рыб и беспозвоночных гидробионтов (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas anguilliseptica*), так и для человека (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*). Нами обнаружено присутствие в микроаэрофильных зонах озера нескольких представителей рода *Aeromonas*, среди которых отмечены штаммы, имеющие высокое сходство с типовым штаммом известного иктиопатогена *A. veronii* bv. *veronii* ATCC 35624^T. Некоторые штаммы *Aeromonas* известны как возбудители широкого спектра заболеваний пойкилотермных и гомеотермных организмов, включая человека [13; 26]. Представители рода *Flavobacterium* в естественных условиях обитания легко распространяются через воду, источником заражения и распространения инфекции являются заболевшие и мёртвые рыбы, а ухудшение качества воды и стресс могут спровоцировать вспышки заболеваний [16].

Псевдомонады, в частности *Pseudomonas anguilliseptica* – известный патоген для рыб, согласно данным рибосомной филогенетики он отнесён к группе *P. aeruginosa*, среди представителей которой отмечено много опасных для человека организмов. Род *Dietzia* включает два вида грамположительных аэробных актиномицетов, которые лишены воздушного мицелия [18]. Несмотря на то что из 13 природных изолятов *D. maris* только для одного описано инфицирование человека [15], он может представлять интерес как условно патогенный микроорганизм. Представители рода *Serratia* – широко распространённые грамтрицательные палочки. Несмотря на принадлежность к семейству Enterobacteriaceae, они не являются обычным компонентом фекальных загрязнений, однако как наиболее распространённый вид *S. marcescens*, так и другие виды (*S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* и *S. odoriferae*), могут быть вторичными инфекционными агентами [19]. Несомненно, все вышеперечисленные организмы являются важными для микробиологического мониторинга и контроля качества вод водоёмов.

Заключение

Использование комплексного методологического подхода (молекулярно-генетический анализ состава микробных сообществ с помощью системы праймеров разного уровня специфичности и культивирование гетеротрофов) позволило охарактеризовать разнообразие водных микроорганизмов в период ранневесенней и летней стратификации оз. Арахлей. Результаты культивирования продемонстрировали ведущую роль в природном микробном сообществе водоёма в период перехода от гомотермии к стратификации доминирующих по численности гетеротрофов.

о начала процесса стратификации водоёма в составе бактериальных популяций кислородных зон бактериальных групп, представленных преимущественно микроаэрофильными и анаэробными микроорганизмами, несмотря на широкую представленность основных фил бактерий. Для оценки качества воды и мониторинга оз. Арахлей как водоёма рыбохозяйственного и рекреационного назначения, в качестве индикаторных определены и предложены представители родов *Bacillus*, *Dietzia*, *Flavobacterium*, *Serratia* и *Staphylococcus*, а также групп *A. hydrophila* (*A. veronii*) и *P. aeruginosa* (*P. anguilliseptica*).

Работа выполнена в рамках ГК № 16.512.11.2130 Министерства образования и науки Российской Федерации, проекта РФФИ № 09-04-00977 и интеграционного проекта № 122.

Литература

1. Белькова Н. Л. Введение в молекулярную экологию микроорганизмов : учеб.-метод. пособие / Н. Л. Белькова, А. М. Андреева. – Ярославль : Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – 91 с.
2. Белькова Н. Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ / Н. Л. Белькова // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоёмов России : учеб.-метод. пособие. – Ярославль : Принтхаус, 2009. – С. 53–63.
3. Ивано-Арахлейский заказник: природно-ресурсный потенциал территории / В. А. Обязов [и др.]. – Чита : Поиск, 2002. – С. 21–27.
4. Матюгина Е. Б. Микробные сообщества / Е. Б. Матюгина // Ивано-Арахлейский заказник : природно-ресурсный потенциал территории. – Чита : Поиск, 2002. – С. 75–80.
5. Михеев И. Е. Факторы риска для популяции окуня *Perca fluviatilis* (озеро Арахлей, Забайкальский край) / И. Е. Михеев, Е. Б. Матюгина // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1 (5). – С. 1317–1320.
6. Молекулярная экология как основа современной методологической базы оценки состояния окружающей среды / С. И. Беликов [и др.] // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1 (4). – С. 1103–1107.
7. Образование некультивируемых форм холерных вибрионов при совместном культивировании с одноклеточными водорослями и продуктами их жизнедеятельности. Холера и патогенные для человека вибрионы / С. В. Титова [и др.]. // Сб. материалов проблемной комиссии. – 2004. – № 17. – С. 37–41.
8. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Кн. 1 / под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. – М. : Изд-во БИНОМ, 2008. – 1080 с.
9. Современные подходы и методология экологического мониторинга в условиях водоёма и в аквакультуре / Е. В. Дзюба [и др.] // Изв. Самар. науч. центра РАН. – 2009. – Т. 11, № 1(3). – С. 466–471.
10. Солохина Л. В. Образование покоящихся форм и изменчивость *Yersinia pseudotuberculosis* под воздействием сине-зелёных водорослей (цианобактерий) и их экзометаболитов / Л. В. Солохина, В. И. Пушкарева, В. Ю. Литвин // Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2001. – № 3. – С. 17–22.
11. Усманов М. Т. Характеристика гидрохимических параметров / М. Т. Усманов, В. Н. Жилин // Ивано-Арахлейский заказник: природно-ресурсный потенциал территории. – Чита : Поиск, 2002. – С. 66–70.

12. Экология микроорганизмов : учеб. для студ. вузов / А. И. Нетрусов [и др.]; ред. А. И. Нетрусов. – М. : Академия, 2004. – 272 с.
13. *Aeromonas caviae keratitis* associated with contact lens wear / A. Pinna [et al.] // *Ophthalmology*. – 2004. – Vol. 111. – P. 348–351.
14. Atlas R. Handbook of Microbiological Media / R. Atlas. – CRC Press, Inc., Boca Raton, 1993.
15. Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient / P. Bemer-Melchior // *Clin. Infect. Dis.* – 1998. – Vol. 29. – P. 1340–1341.
16. Brun E. Faglige vurderinger av behov for kontrolltiltak overfor *Flavobacterium psy chrophilum* i norsk lakseproduksjon / E. Brun, H. Nilsen, A. B. Olsen. – Norwegian, Oslo, 2009. – report series 13 : National Veterinary Institute. – 20 p.
17. Dale J. W. Molecular Genetics of Bacteria. 5th Edition. / J. W. Dale, S. F. Park. – Chichester : John Wiley and Sons Ltd, 2010. – 400 p.
18. *Dietzia*, a new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris* / F. A. Rainey [et al.] // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 45. – P. 32–36.
19. Donnenberg M. S. Enterobacteriaceae / M. S. Donnenberg // Principles and Practice of Infectious Diseases. – Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone, Elsevier, 2010. – Vol. 2, N 7. – P. 2815–2833.
20. Draft ISO/DIS 4833 International Organization for Standardization, 1991.
21. Environmental Microbiology : Current technology and water application / eds.: K. Sen, N. J. Ashbolt. – Norfolk : Caister Academic Press, 2011. – 316 p.
22. Hahn M. W. The filtration-acclimatization method for isolation of an important fraction of the not readily cultivable bacteria / M. W. Hahn, P. Stadler, L. W. Qinglong // *Microbiol. Methods*. – 2004. – Vol. 57. – P. 379–390.
23. Oliver J. D. The viable but nonculturable state and cellular resuscitation / J. D. Oliver // *Microbial Biosystems* : New Frontiers. – Atlantic Canada Soc. Microb. Ecol., Halifax, Canada, 2000. – P. 723–730.
24. PCR troubleshooting and optimization. The essential guide / eds.: S. Kennedy, N. Oswald. – Norfolk : Caister Academic Press, 2011. – 235 p.
25. Sequence similarity searching. FASTA [Electronic recourse]. URL: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta>
26. Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water 18th ed. / Eds. A. E. Greenberg, L. S. Clesceri, A. D. Eaton. – Washington D.C. : APHA, 1992.
27. The genus *Aeromonas* / B. Austin [et al.]. – Chichester, U.K. : John Wiley & Sons, 1996. – 350 p.

Characterization of structure of microbial communities and evaluation of water quality with primer sets of different level of specificity

N. L. Bel'kova^{1,2}, E. B. Matyugina³, E. V. Dzyuba¹, N. N. Denikina¹,
E. V. Sukhanova¹, M. P. Belykh²

¹Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

²Irkutsk State University, Irkutsk

³Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology SB RAS, Chita

Abstract. Complex analysis of heterotrophic microbial communities at different depth of Lake Arakhley during periods of early spring and summer stratification allowed establishing trophic stability and main role of dominant heterotrophs. It was shown that minor forms of heterotrophs were found in uncultivable stage and were not involved in metabolic cycles of water reservoir during transit from homothermy to stagnation. The spectrum of heterotrophic microorganisms-indicators for lake water quality estimation was determined by molecular-genetic analysis of microbial communities with primer sets of different taxonomic levels and cultivation on selective media.

Key words: water quality, heterotrophic microorganisms, Lake Arakhley, molecular-genetic analysis, primer sets

Белькова Наталья Леонидовна
Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук, доцент,
старший научный сотрудник
тел. (3952)42–54–15, факс (3952)42–54–05
E-mail: belkova@lin.irk.ru

Bel'kova Nataliya Leonidovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, ass. prof.,
senior research scientist
phone: (3952)42–54–15, fax: (3952)42–54–05
E-mail: belkova@lin.irk.ru

Матюгина Евгения Борисовна
Институт природных ресурсов, экологии
и криологии СО РАН,
672000, г. Чита, ул. Бутина, 26, а/я 147
учёный секретарь, кандидат биологических наук
тел.: (3022)20–60–02
E-mail: evgenia48@mail.ru

Matyugina Evgeniya Borisovna
Institute for Natural Resources, Ecology
and Cryology SB RAS
26 Butin St., Chita, 672000
Ph.D. in Biology, Scientific Secretary
phone: 8(3022)20–60–02
E-mail: evgenia48@mail.ru

Дзюба Елена Владимировна
Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук,
и. о. заведующего лабораторией
тел. (3952)42-26-95, факс (3952)42-54-05
E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Деникина Наталья Николаевна
Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
кандидат биологических наук, доцент,
старший научный сотрудник
тел. (3952)42-84-22, факс (3952)42-54-05
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Суханова Елена Викторовна
Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
научный сотрудник
тел. (3952)42-54-15, факс (3952)42-54-05
E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Белых Марина Петровна
Иркутский государственный университет
664003 г. Иркутск, ул. Сухэ-Батора, 5
студент
тел. (факс) (3952)24-18-55
E-mail: maryline606@mail.ru

Dzyuba Elena Vladimirovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph. D. in Biology, Head of laboratory

phone: (3952)42-26-95, fax: (3952)42-54-05
E-mail: e_dzuba@lin.irk.ru

Denikina Nataliya Nikolaevna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
Ph.D. in Biology, ass. prof.,
senior research scientist
phone: (3952)42-84-22, fax: (3952)42-54-05
E-mail: denikina@lin.irk.ru

Sukhanova Elena Viktorovna
Limnological Institute SB RAS
3 Ulan-Batorskaya St., Irkutsk, 664033
research scientist
phone: (3952)42-54-15, fax: (3952)42-54-05
E-mail: sukhanova@lin.irk.ru

Belykh Marina Petrovna
Irkutsk State University
5 Sukhe-Bator St., Irkutsk, 664003
student
phone (fax): (3952)24-18-55
E-mail: maryline606@mail.ru