

УДК 504.054:579.8 (282.256.341)
doi:10.23968/2305–3488.2017.21.3.99–113

**Верхозина Е. В., Верхозина В. А., Верхотуров В. В., Букин Ю. С.,
Сафаров А. С.**

АНАЛИЗ МИКРОБИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА В ЛИТОРАЛЬНОЙ ЗОНЕ ЮЖНОЙ ЧАСТИ ЭКОСИСТЕМЫ ОЗЕРА БАЙКАЛ

UDC УДК 504.054:579.8 (282.256.341)
doi:10.23968/2305–3488.2017.21.3.99–113

VERKHOZINA E. V., VERKHOZINA V. A., VERKHOTUROV V. V. , BUKIN U. S, SAFAROV A. S.

ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY IN THE LITTORAL ZONE OF SOUTHERN LAKE BAIKAL ECOSYSTEM

Аннотация

В настоящее время одной из важнейших проблем человечества становится антропогенное загрязнение природных вод химическими веществами и микроорганизмами. Анализированы ряды многолетних мониторинговых исследований бактериальных штаммов, выделенных из прибрежной части (литораль) и глубоководной зоны (пелагиаль) экосистемы озера Байкал. Проведен анализ на устойчивость бактерий к антибиотикам и наличие ферментов эндонуклеаз рестрикции (ЭР). Выявлено, что в условиях активного антропогенного загрязнения литоральной зоны экосистемы Байкала, с 2003 г. наблюдается появление бактериальных штаммов, устойчивых ко многим антибиотикам. Анализ полученных результатов показал, что устойчивость к антибиотикам в разные месяцы в течение одного года достоверно отличается друг от друга ($P_value = 0.003 < \alpha$). Дисперсионный анализ усредненной устойчивости бактерий к антибиотикам за рассматриваемый период, практически не выявил межгодового различия ($P_value = 0.34 < \alpha$). При расчете попарных коэффициентов корреляции удалось разделить антибиотики на три группы. Первая –

Abstract

Currently one of the most important problems of humanity is the contamination of natural waters by substances of anthropogenic nature, such as chemical substances and microorganisms. Analyzed the ranks of the long-term monitoring studies of bacterial strains isolated from coastal (littoral) and deepwater zone (pelagic) ecosystems of lake Baikal. The analysis of the resistance of bacteria to antibiotics and the presence of enzymes endonucleases (ER). It is revealed that in conditions of intensive anthropogenic pollution of intertidal zone ecosystems of lake Baikal since 2003 there is the appearance of bacterial strains resistant to many antibiotics. Analysis of the obtained results showed that antibiotic resistance in different months during one year differs significantly from each other ($P_value = 0.003 < \alpha$). Analysis of variance of the average resistance of bacteria to antibiotics during the period under review, almost did not reveal interannual differences ($P_value = 0.34 < \alpha$). When calculating the pairwise correlation coefficients it was possible to divide antibiotics into three groups. The first antibiotic resistance is formed independently from each other ($r \approx 0$). The second group of pairs with significant



устойчивость к антибиотикам формируется независимо друг от друга ($r \approx 0$). Вторая группа – пары с достоверными положительными значениями коэффициентов корреляции ($r > 0$), формирование перекрестной устойчивости. Третья группа – это пары антибиотиков с достоверными отрицательными значениями коэффициентов корреляции ($r < 0$). В бактериальных сообществах увеличение устойчивости к одному антибиотику сопровождалось уменьшением устойчивости к другому. Многолетними исследованиями установлено, что большое разнообразие ЭР встречается в бактериальных штаммах, выделенных из проб, отобранных в местах, где наблюдается антропогенное влияние. При анализе полученных данных выявлено, что районы отбора проб сильно отличаются по количеству обнаруживаемых ЭР (от 1 до 7). Чем больше бинарное расстояние, тем больше различий в спектре обнаруживаемых ЭР. Различия по бинарному расстоянию доходят до 1 (100%), это означает, что ЭР, встречающиеся в одной точке отбора не встречаются в пробах, отобранных в других местах. Имеются две пары точек отбора проб, где их спектры не отличаются. Внутри каждой пары этих точек ЭР оказались однотипными, но сами пары отличались (бинарное расстояние 1 -100%). Применение методов статистического анализа позволяет выявить основные закономерности изменения микробного сообщества экосистемы Байкала и в дальнейшем комплексно подойти к решению проблемы водопользования.

Ключевые слова: статистическая обработка, кластерный анализ, дисперсионный метод, ферменты эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы), микроорганизмы, озеро Байкал.

Авторы

Верхозина Елена Владимировна
кандидат биологических наук, научный сотрудник
Институт земной коры СО РАН
E-mail: verhel@crust.irk.ru

positive values of correlation coefficients ($r > 0$), the formation of cross-resistance. The third group is a couple of antibiotics with reliable negative values of correlation coefficients ($r < 0$). In bacterial communities increased resistance to one antibiotic was accompanied by decreased resistance to another. Also, long-term studies have established that a large variety of ER is found in bacterial strains isolated from the samples taken in places where there is anthropogenic influence. The analysis of the obtained data revealed that the areas of sampling differ in the number of detectable ER (1 to 7). The more in binary the distance, the more differences in the spectrum of detectable ER. The differences on binary distance reaches up to 1 (100%), this means that ER occurring at the same point selection does not occur in the samples taken in other places. There are two pairs of sampling points, where their spectra are not different. Inside each pair of these points ER was similar, but the pairs different (binary 1 -100%). The application of statistical analysis techniques allows to identify the main regularities of changes in the microbial community of the ecosystem of lake Baikal and in the future, a comprehensive approach to solving the problem of water use.

Keywords: statistical processing, cluster analysis, dispersion method, restriction endonuclease enzymes (restriction enzymes), microorganisms, Lake Baikal.

Authors

Elena Vladimirovna Verkhovina
Ph.D. of Biological Sciences, Research Officer
Institute of the Earth's Crust of the Siberian
Branch of the Russian Academy of Sciences,
E-mail: verhel@crust.irk.ru

Верхозина Валентина Александровна

доктор технических наук, профессор
Иркутский национальный исследовательский
технический университет
E-mail: verhval@mail.ru

Valentina Aleksandrovna Verkhovina

Doctor of Engineering Science, professor
National Research Irkutsk State Technical
E-mail: verhval@mail.ru;

Верхотуров Василий Владимирович

доктор биологических наук, профессор
Иркутский национальный исследовательский
технический университет
E-mail: biovervv@mail.ru

Vasilij Vladimirovich Verkhoturov

Doctor of Biological Sciences, professor
National Research Irkutsk State Technical
E-mail: biovervv@mail.ru

Букин Юрий Сергеевич

кандидат биологических наук, старший науч-
ный сотрудник
Лимнологический институт Сибирского отде-
ления Российской академии наук;
Доцент
Иркутский национальный исследовательский
технический университет,
E-mail: bukinyura@mail.ru

Yurij Sergeevich Bukin

Ph.D. of Biological Sciences, Senior Research
Officer
Limnological Institute Siberian Branch of the
Russian Academy of Sciences;
Associate Professor
Limnological Institute Siberian Branch of the
Russian Academy of Sciences
E-mail: bukinyura@mail.ru

Сафаров Алексей Саматович

ведущий инженер
Институт систем энергетики им. Л.А. Мелен-
тьева СО РАН;
аспирант
Иркутский национальный исследовательский
технический университет
E-mail: alexssss@list.ru

Aleksej Samatovich Safarov

Lead Engineer
Melentiev Energy Systems Institute of Siberian
Branch of the Russian Academy of Sciences;
postgraduate student
L. A. Melentiev Energy Systems Institute,
Siberian Branch of the Russian Academy of
Sciences
E-mail: alexssss@list.ru

Одной из актуальнейших проблем в экологических исследованиях является выявление антропогенного фактора при загрязнении природных пресных вод. Озеро Байкал представляет собой сложную экосистему, состоящую из нескольких подсистем. Это пелагиаль озера, максимальная глубина составляет 1640 м, средняя – 744 м. Причем, южная и средняя котловины озера имеют глубины более 1000 м. Глубины заливов, проливов, литораль озера составляют несколько метров. Кроме того, для озера характерна пространственно-временная неоднородность развития планктона (явление пэтчинга), в том числе микроорганизмов [1]. Поэтому выявить характер поступления органического вещества (природный или антропогенный характер) в экосистему бывает очень трудно. При многолетних мониторинговых наблюдениях поиск индикаторов антропогенного воздействия на водные экосистемы очень непростая задача.



Микроорганизмы способны реагировать на поступление многих веществ в экосистемы, особенно на ранней стадии.

Одной из важной биологической характеристики микроорганизмов является их устойчивость к антимикробным препаратам. Исследованиями ряда авторов показано, что в объектах, где наблюдается антропогенное воздействие, создаются благоприятные условия для формирования и сохранения устойчивых к антибиотикам бактериальных штаммов. [2; 3]. Выявлено, что под воздействием деятельности человека происходят значительные нарушения в биосинтезе ферментов эндонуклеаз рестрикции (ЭР) в микроорганизмах. Продуценты рестриктаз, известные ранее лишь теоретически, были обнаружены в районах антропогенного влияния. В штаммах бактерий, выделенных из чистых участков озера, все обнаруженные нами рестриктазы являются хорошо известными. Так, например, штамм бактерий *F. aquatilis* – продуцент рестриктазы Fan I – был выделен из воды оз. Байкал в районе пос. Листвянка. Штамм бактерии *A. calcoaceticus* – продуцент рестриктазы Aca I – был выявлен в районе г. Байкальска. Продуцент *Bacillus sphaericus* эндонуклеазы рестрикции Bsi I, Штамм *Bacillus sphaericus* – продуцент рестриктазы Bsi I, которая является новым ферментом среди рестриктаз – был выделен из этого же района. В истоке р. Ангары выделен штамм бактерии *Curtobacterium citrium*, продуцент Cci NI, который является изошизомером Not I. [4; 5]. Из районов антропогенного влияния экосистемы оз. Байкал также были выделены штаммы микроорганизмов, в которых обнаружены уникальные и редкие ЭР. В чистых фоновых районах экосистемы Байкала: пелагиаль озера, осадки возрастом более 5 млн. лет, ЭР встречаются редко (менее 1%), чаще вообще не обнаруживаются [6–8]. Таким образом, сравнение состава микроорганизмов по наличию или отсутствию ЭР позволяет утверждать, что на ранней стадии загрязнения, эти ферменты могут являться индикаторами на антропогенное воздействие.

Цель данной работы – с использованием статистических методов анализа проанализировать полученные результаты многолетних мониторинговых наблюдений по микроорганизмам, выделенным из литоральной зоны южной части экосистемы озера Байкал на устойчивость их к антибиотикам и наличием ферментов рестриктаз.

Экспериментальная часть

Отбор проб производился согласно ГОСТ 51592–2000 как в литорали (прибрежная часть), так и в пелагиали (глубинная часть) озера Байкал с 2000–2013 гг., в различные биологические сезоны. Пробы воды в прибрежной части отбирали с поверхностного горизонта в трех метрах от берега, в глубоководной – с разных горизонтов водной толщи (до 1200 м). Отбор проб воды в литорали производился по схемам (рис. 1, рис. 2, рис. 3).



Рис.1. Схема отбора проб в литоральной зоне южной части оз. Байкал, район п. Листвянка. 1 – исток р. Ангары, 2 – порт Байкал, 3 – паром в порт Байкал, 4 – пристань напротив гостиниц, 5 – сауна для дайверов, 6 – падь Банная, 7 – падь Крестовка, 8 – падь Черемшанка, 9 – пристань



Рис. 2. Схема отбора проб в литоральной зоне южной части оз. Байкал, район г. Байкальска 10 – напротив БЦБК, 11 – возле института токсикологии, 12 – пляж, 13- зона отдыха, 14 – стоянка кораблей (залив), 15 – место отдыха, 16 – стоянки туристов

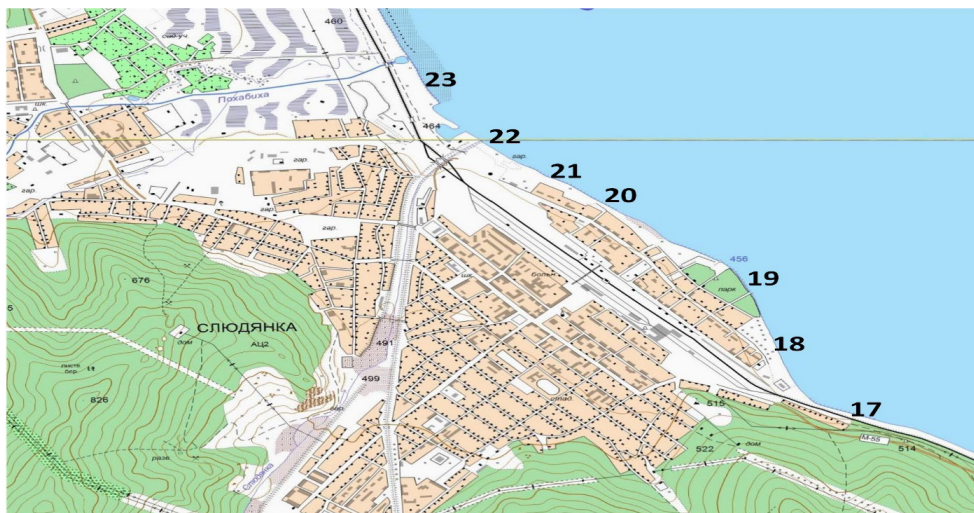


Рис. 3. Схема отбора проб в литоральной зоне южной части оз. Байкал, район г. Слюдянка. 17 – место отдыха, 18 – дачи, 19 – стоянка туристов, 20 и 22 – земли поселений, 22 – напротив железнодорожного вокзала, 23 – пляж

За время исследований выделено и проанализировано более 3500 штаммов микроорганизмов. Обработка материала осуществлялась согласно общепринятым подходам и методам, подробно описанным в работах [9]. Идентификацию выделенных микроорганизмов и определение их устойчивости к 12 антимикробным препаратам шести фармакологических групп: пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, фторхинолоны, тетрациклины, диаминопиримидины, осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками Госсанэпиднадзора Минздрава России [10]. Поиск штаммов-продуцентов ферментов ЭР с новой специфичностью, определенными физико-химическими свойствами осуществлялся согласно методики, подробно описанной в работах [11; 12]. При анализе полученных результатов был применен метод корреляционного анализа [13–15] с использованием стандартных параметрических и непараметрических критериев. Этот метод часто применяется в биомедицинской литературе для выявления причинно-следственных связей и позволяет определить силу и направление вариабельности между переменными и считается одним из перспективных, особенно при обширном массиве полученных данных в результате проведенных исследований. Для статистической обработки и систематизации данных использовался кластерный анализ с помощью дистанционного метода UPGMA. В зависимости от вида

систематизации данных, проводилась визуализация результатов анализа активности ЭР, обнаруженной в штамме бактерии с помощью столбчатых диаграмм. Систематизация исходного массива данных, кластерный анализ и визуализация столбчатых диаграмм проводилась с помощью базовых средств языка программирования R, предназначенного для статистической обработки данных.

Результаты исследования и обсуждение

Проведенные многолетние мониторинговые исследования выявили, что в условиях активного антропогенного загрязнения литоральной зоны экосистемы Байкала, с 2003 г. наблюдается появление бактериальных штаммов, устойчивых ко многим антибиотикам. Установлено, что величина устойчивости бактериальных штаммов к антибиотикам в разные месяцы года достоверно отличается друг от друга ($P_value = 0.003 < \alpha$). Дисперсионный анализ усредненной устойчивости бактерий к антибиотикам за рассматриваемый период, практически не выявил межгодового различия в близкие годы ($P_value = 0.34 < \alpha$). При расчете попарных коэффициентов корреляции удалось разделить антибиотики на три группы. Первая – устойчивость пар антибиотиков формируется независимо друг от друга (значения коэффициента корреляции $r \approx 0$). Вторая группа – пары с достоверными положительными значениями коэффициентов корреляции ($r > 0$), т. е. увеличение устойчивости к одному антибиотику сопровождалось увеличением устойчивости к другому антибиотику, формированию перекрестной устойчивости. Третья группа – это пары антибиотиков с достоверными отрицательными значениями коэффициентов корреляции ($r < 0$). В бактериальных сообществах для таких пар антибиотиков увеличение устойчивости к одному антибиотику сопровождалось уменьшением устойчивости к другому.

Значение коэффициентов вариации устойчивости бактериальных сообществ к антибиотикам можно разделить на две группы. Первая группа: антибиотики с относительно небольшими значениями коэффициентов вариации устойчивости к ним бактериальных сообществ (коэффициент вариации < 1). К таким антибиотикам относятся: ампициллин, хлорамфеникол, невидграммон, триметоприм. Устойчивость к антибиотикам этой группы изменяется в меньшей мере при переходе от сезона к сезону года. Вторая группа: антибиотики с относительно высокими значениями коэффициентов



вариации устойчивости к ним бактериальных сообществ ($1 < \text{коэффициент вариации} < 1,75$). Это тетрациклин, стрептомицин, канамицин, гентамицин, рифампицин, цефазолин, цефатоксим, пefфлоксацин (рис. 4). Обращает на себя внимание факт того, что эти бактериальные штаммы выделены фактически из питьевой воды, т. к. местное население традиционно берет воду из озера для бытовых нужд и для потребления. Существующее раньше точка зрения, что «бактерии-пришельцы» погибают в холодной воде Байкала, оказалась несостоятельна.

Таким образом, применение предложенных методов при анализе большого объема полученных результатов выявил, что исследуемые выборки не распределены по нормальному закону ($P_value < \alpha$). В связи с этим, для дисперсионного анализа использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса, а для корреляционного анализа - непараметрический коэффициент корреляции Спирмена.

Для выявления условий синтеза ферментов рестриктаз (ЭР) в прибрежной части экосистемы оз. Байкал в определенном месте отбора проб при проведении кластерного анализа было выявлено 28 типов различных типов ЭР (рис. 5).

Частоту встречаемости ферментов ЭР можно разделить на несколько типов:

1) редко встречающиеся рестриктазы (обнаруживались только в штамме бактерии, выделенной только из одной пробы) к ним относятся AccI, NcoI, Sall, Scall, HpaII, Fun4HI, HgiEII, NruI, HgiCI, Avall, MwoI, CaurI;

2) относительно небольшим распространением ЭР (обнаружены в 2–4 пробах), к ним относятся XhoI, Bpu1I, EcoRV, Ball, XhoII, EspI, DraII, EcoRII, San96I, BamHI;

3) достаточно распространенные ЭР (выявлены в 6-13 пробах), к ним относятся HaeIII, ClaI, MboI, PstI. Следует заметить, что наиболее распространенная рестриктаза MboI была обнаружена 14 пробах, а это оставляет 21% от всего числа исследованных (66 проб) все остальные ЭР встречались реже (1,5% - 15% от всех проанализированных проб).

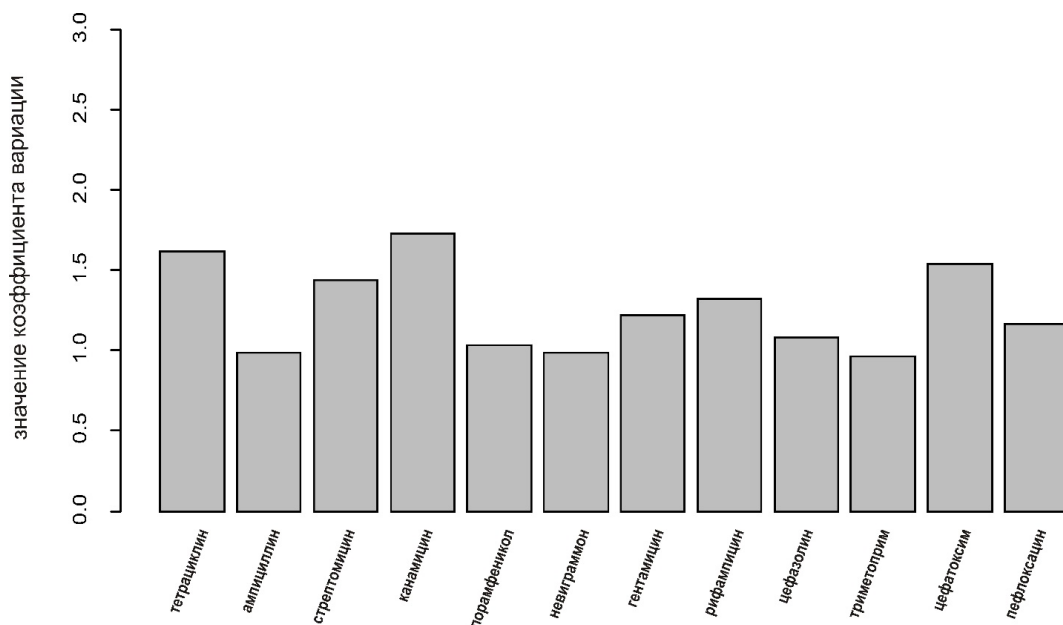


Рис. 4. Значение коэффициентов вариации показателей устойчивости бактерий к антибиотикам (мкг/мл)

При анализе полученных данных установлено, что районы отбора проб сильно отличаются по количеству обнаруживаемых ЭР (от 1 до 7). На дендрограмме (рис. 6 справа) видно, что большинство точек отбора проб очень отличаются по спектру встречающихся ЭР. Чем больше бинарное расстояние, тем больше различий в спектре обнаруживаемых ЭР. Различия по бинарному расстоянию доходят до 1 (100%), это означает, что ЭР, встречающиеся в одной точке отбора не встречаются в пробах, отобранных в других местах. Имеются две пары точек отбора проб, где их спектр не отличается. На столбчатой диаграмме (слева) видно, что во всех этих точка обнаруживалась ЭР только какого-то одного типа. Внутри каждой пары этих точек ЭР оказались однотипными, но сами пары отличались (бинарное расстояние 1 – 100%). Таким образом, выявлено, что в районе п. Листвянка большое разнообразие ЭР встречается в микроорганизмах, выделенных из проб, отобранных в местах, где наблюдается разнообразное антропогенное влияние: бани, сауны, гостиницы, стоки из ресторанов и закусочных, мест содержания животных.

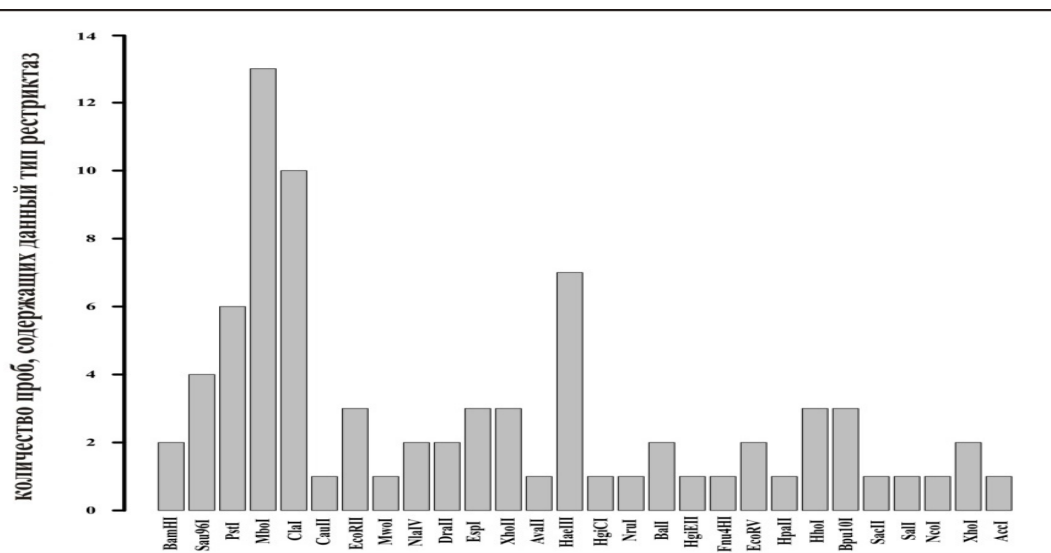


Рис. 5. Частота встречаемости рестриктаз (ЭР) различного типа в совокупности проанализированных проб

Полученные результаты показали, что в прибрежной части экосистемы озера, количество различных типов рестриктаз можно разделить на 3 группы:

1. Количество ЭР в выделенных штаммах составляет от 5 до 7 типов. Место отбора проб: точка 5 – сауна для дайверов (п. Листвянка), 10 – напротив БЦБК, 14 – стоянка кораблей (залив), район г. Байкальска.
2. Количество ЭР в выделенных штаммах составляет 4 типа. Точки отбора проб: 1 – исток р. Ангары, 3 – паром в порт Байкал, 4 – пристань напротив гостиницы, 7– падь Крестовка, 9 – пристань (район п. Листвянка), 18 – дачи (район г. Слюдянка).
3. Численность выявленных ферментов составляет от 1 до 2 типов рестриктаз. Это все остальные точки отбора проб.

Таким образом, выявлено что большое разнообразие ЭР встречается в бактериальных штаммах, выделенных из проб, отобранных в местах, где наблюдается разнообразное антропогенное влияние: бани, сауны, дачи, гостиницы, стоки из ресторанов и закусочных. Так, самое большое разнообразие и количество выявленных ферментов ЭР наблюдается в литоральной зоне напротив п. Листвянка.

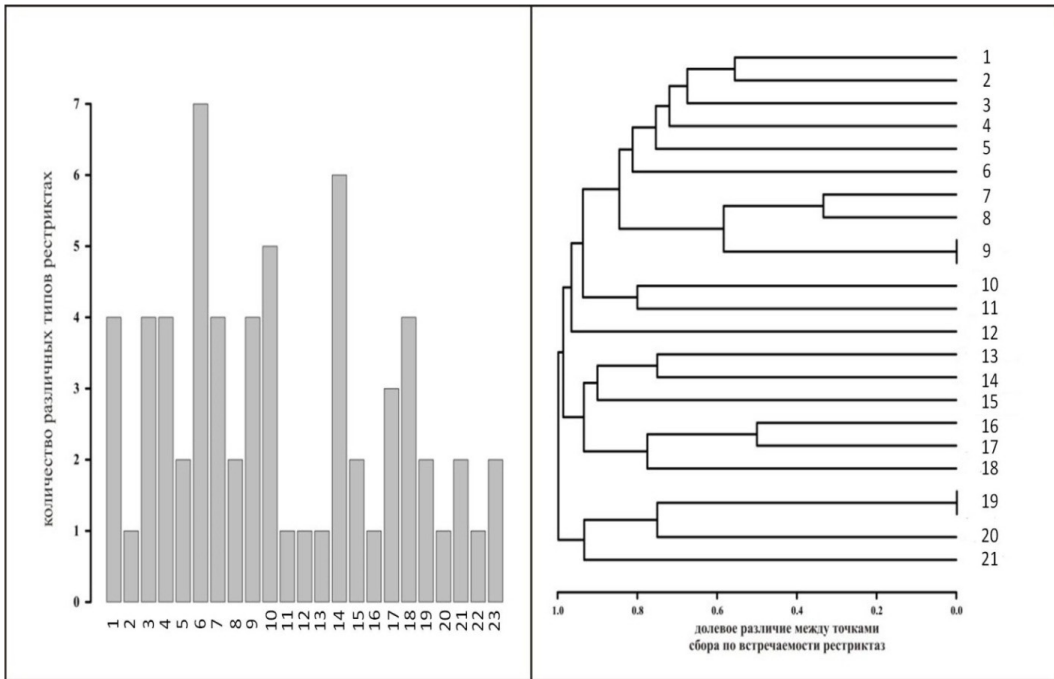


Рис. 6. Количество различных типов рестриктаз в различных точках отбора проб (правая часть). Кластерная дендрограмма UPGMA сходства (различия) по спектру обнаруживаемых рестриктаз в разных точках отбора проб

Это самое близкое расстояние до оз. Байкал (70 км) от г. Иркутска. Поэтому кроме туристов, этот район активно используется горожанами для отдыха. Оказалось, что место отбора проб, где расположена сауна для дайверов, выведенная прямо в озеро (точка 5) является хорошим местом для штаммов-продуцентов рестриктаз. В районе г. Байкальска выявлено две таких точки: в месте впадения стоков Байкальского целлюлозно-бумажного комбината (точка 10), куда много лет спускались очищенные сточные воды комбината и бытовые стоки г. Байкальска. Теперь возможен подток из твердых отходов комбината, складированных неподалеку. Стоянка судов (залив), также можно считать подходящей средой для образования ЭР в бактериях (точка 14). Все хозяйственно-бытовые стоки судов выходят прямо в озеро без какой-либо очистки. Меньшее разнообразие, но не меньшее количество, ЭР наблюдается в истоке р. Ангары, где неподалеку спускаются очищенные бытовые стоки жилых домов, гостиниц и корпусов санатория «Байкал», Лимнологического института и гостиницы «Интурист». Также, район парома, курсирующего в порт Байкал и обратно (т. 3), пристань напротив гостиницы «У озера» (т. 4),



падь Крестовка, где расположено много земель поселений и ручей впадающий в озеро, который смывает мусорные свалки и бытовые отходы (т. 7), Пристань (т. 9), где помимо кораблей расположено много закусочных и кафетериев (район п. Листвянка), 18 – дачи с мусорными свалками (район г. Слюдянка). Можно считать, что в остальных точках отбора проб, где разнообразие выявленных ЭР составляет от 1 до 2 типов рестриктаз. В глубоководных районах экосистемы Байкала (пелагиаль озера), а также в древних осадках, ферменты ЭР не выявляются в выделенных штаммах микроорганизмов. Известно, что эти ферменты в природе выполняют защитную роль, оберегая природные штаммы бактерий от «пришельцев». Из районов антропогенного влияния экосистемы оз. Байкал были выделены штаммы микроорганизмов, в которых обнаружены уникальные и редкие ЭР.

Заключение

Таким образом, в условиях антропогенного загрязнения водных экосистем, микробиологический мониторинг и интерпретация его результатов приобретают особенности, позволяющие обозначить не только санитарно-эпидемиологические прогнозы, но и направление изменения микробных сообществ. Сложность выявления влияния антропогенного фактора на водные экосистемы в таких сложных экосистемах как Байкал, их изменчивость и непредсказуемость всех возможных результатов воздействия, обуславливают необходимость совершенствования микробиологического мониторинга окружающей среды. Особо следует обращать внимание на методы обработки полученных результатов. Применение предложенных методов дает возможность обосновывать изменение бактериального сообщества в экосистеме оз. Байкал. Анализ полученных результатов многолетних мониторинговых наблюдений по изменению микроорганизмов, выделенных из литоральной зоны южной части экосистемы озера Байкал показал, что изменение устойчивости бактериальных штаммов к антибиотикам в разные месяцы в течение одного года имеет достоверное отличие ($P_value = 0,003 < \alpha$). Дисперсионный анализ усредненной устойчивости бактерий к антибиотикам за рассматриваемый период, практически не выявил межгодового различия в близкие годы ($P_value = 0,34 < \alpha$). При расчете попарных коэффициентов корреляции удалось разделить антибиотики на три группы. Первая – устойчивость к антибиотикам формируется независимо друг от друга (значения коэффициента корреляции $r \approx 0$). Вторая группа – пары с достоверными положительными значениями коэффициентов корреляции ($r > 0$), т. е. увеличение устойчивости к одному антибиотику сопровождается увеличением устойчивости к другому антибиотику, т. е. формирование

перекрестной устойчивости. Третья группа – это пары антибиотиков с достоверными отрицательными значениями коэффициентов корреляции ($r < 0$). Также, многолетними исследованиями установлено, что большое разнообразие ферментов рестриктаз (ЭР) встречается в бактериальных штаммах, выделенных из проб, отобранных в местах, где наблюдается антропогенное влияние: бани, сауны, дачи, гостиницы, стоки из ресторанов и закусовых. В чистых фоновых районах экосистемы Байкала: пелагиаль озера, ЭР встречаются редко (менее 1%) или вовсе не обнаруживаются. Предложено при многочисленных полученных данных при мониторинговых наблюдениях и выявления причинно-следственных связей и вариабельности между переменными использовать дисперсионный и корреляционный методы анализа. Таким образом, при пространственно-временных неоднородностях распределения живого вещества в экосистеме Байкала, удалось установить многие скрытые факторы, описанные в статье.

Литература

1. Верховина, В. А., Куснер, Ю. С., Сафарова, В. А., Судакова, Н. Д. (1988). Мелкомасштабная турбулентность и пэтчинг бактериопланктона на Байкале. Т. 301. № 6. С. 1508–1512.
2. Анганова, Е. В. (2014). Гетерогенность микробных сообществ поверхностных водоемов по показателям антибиотикорезистентности бактерий. Гигиена и санитария. № 4, С. 19–22.
3. Верховина, Е. В. (2014). Антибиотикоустойчивость микробного сообщества экосистемы озера Байкал в районе п. Листвянка, г. Слюдянки и г. Байкальска. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, № 3. С. 62–65.
4. Дедков, В. С. (1990). Выявление штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции среди водных микроорганизмов озера Байкал. Известия Сибирского отделения АН СССР. Сер. «Биол. науки». № 1. С. 35–37.
5. Гончар, Д. А. (1998). Эндонуклеаза рестрикции Sse9I из штамма *Sporosarcina* sp. 9D, узнающая последовательность ДНК 5'-AATT-3'. Молекулярная генетика, № 1. С. 32–34.
6. Верховина, В. А. (2004). Микроорганизмы озер Байкал и Ньяса как индикаторы антропогенного влияния и перспектива их использования в биотехнологии. Прикладная биохимия и микробиология. Т. 40. № 4. С. 455–459.
7. Верховина, В. А. (2014). Разработка и апробация физико-химических методов в экологических исследованиях. Вода: химия и экология, № 3, С. 66–70.
8. Верховина, Е. В. (2016). Поиск штаммов-продуцентов эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз) среди микроорганизмов оз. Байкал и их применение в экологических исследованиях. Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология, № 1 (16), С. 44–50
9. «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества». Методики МУК 4.2.671-97, разработанные СанПиН 2.1.4.559-96.
10. (2004). Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 91 с.



11. Белавин, Н. А. (1988). Метод определения эндонуклеаз рестрикции в колониях бактерий. Прикладная биохимия и микробиология. Т. 24, в.1. С. 129–132.
12. Дегтярев, С. Х. (1987). Установление специфичности эндонуклеазы рестрикции Vne I. Биоорганическая химия. Т. 13, № 3. С. 422–423.
13. Амшарин, Н. П. (1962). Статистические методы в микробиологических исследованиях. М.:Медгиз. 180 с.
14. Савилов, Е. Д. (2011). Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала. Н.: Наука-Центр, 156 с.
15. Kraemer, H. (2006). Correlation coefficients in medical research: from product moment correlation to the odds ratio. *Statistical Methods in Medical research?* Vol. 15? pp. 525–544.

References

1. Verhozina, E. V. (2014). Antibiotikoustojchivost' mikrobnogo soobshhestva jekosistemy ozera Bajkal v rajone p. Listvjanka, g. Sljudjanki i g. Bajkal'ska [Antibiotic resistance of the microbial community of the ecosystem of Lake Baikal in the vicinity of Listvyanka, Slyudyanka and Baikalsk]. *Bjulleten' VSNC SO RAMN [Bulletin of the All-Union Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences]*, 3: 62–65.
2. Anganova, E. V. (2014). Geterogenost' mikrobnih soobshhestv poverhnostnyh vodoemov po pokazateljam antibiotikorezistentnosti bakterij [Heterogeneity of microbial communities of surface water bodies according to the antibiotic resistance of bacteria]. *Gigiena i sanitarija [Hygiene and Sanitation]*, 4: 19–22.
3. Verhozina, E. V. (2016). Primenenie dispersionnogo i korreljacionnogo metodov analiza pri issledovanii antibiotikorezistentnosti mikroorganizmov ozera Bajkal [Application of dispersion and correlation methods of analysis in the study of antibiotic resistance of microorganisms of Lake Baikal. *Water: chemistry and ecology*]. *Voda: himija i jekologija [Water: chemistry and ecology]*, 12: 67–73.
4. Verhozina, V. A., Verhozina, E. V., Gonchar, D. A., Dedkov, V. S. (2004). Mikroorganizmy ozer Bajkal i N'jasa kak indikatory antropogennogo vlijaniya i perspektiva ih ispol'zovaniya v biotehnologii [Microorganisms of Lake Baikal and Nyasa as indicators of anthropogenic influence and the prospect of their use in biotechnology]. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija [Applied Biochemistry and Microbiology]*, 40(4): 455–459.
5. Verhozina, V. A., Verhozina, E. V., Gonchar, D. A., Dedkov (2014). Razrabotka i aprobacija fiziko-himicheskikh metodov v jekologicheskikh issledovanijah [Development and approbation of physical and chemical methods in environmental studies]. *Voda: himija i jekologija [Water: chemistry and ecology]*, 3, pp. 66–70.
6. Dedkov, V. S., Repin, V. E., Rechkunova, N. I. Degtjarev, S. H., Verhozina, V. A. (1990). Vyjavlenie shtammov-producentov jendonukleaz restrikcii sredi vodnyh mikroorganizmov ozera Bajkal [Detection of strains producing endonuclease restriction among aquatic microorganisms of Lake Baikal]. *Izvestija Sibirskogo otdelenija AN SSSR. Ser. «Biol. nauki» [Izvestiya of the Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences. Ser. «Biol. Science «], 1, pp. 35–37.*
7. Gonchar, D. A., Dedkov, V. S., Verhozina, V. A. (1998). Jendonukleaza restrikcii Sse9I iz shtamma Sporosarcina sp. 9D, uznajushhaja posledovatel'nost' DNK 5'-AATT-3' [The restriction endonuclease Sse9I from the strain Sporosarcina sp. 9D, recognizing the DNA sequence 5'-AATT-3']. *Molekuljarnaja genetika [Molecular Genetics]*, 1, pp. 32–34.
8. Verhozina, E. V., Verhozina, V. A., Verhoturov, V. V., Anganova, E. V., Savilov, E. D. (2016). Poisk shtammov-producentov jendonukleaz restrikcii (restriktaz) sredi mikroorganizmov oz. Bajkal i ih primenenie v jekologicheskikh issledovanijah [Search of strains producers of restriction endonucleases (restriction enzymes) among microorganisms of the lake. Baikal and their application

in environmental studies]. *Izvestija Vuzov. Prikladnaja himija i biotehnologija* [Proceedings of Higher Educational Institutions. Applied Chemistry and Biotechnology], 1(16), pp. 44–50.

9. Pit'evaja voda. Gigienicheskie trebovanija k kachestvu vody centralizovannyh sistem pit'evogo vodosnabzhenija. Kontrol' kachestva. metodiki MUK 4.2.671-97, razrabotannye SanPiN 2.1.4.559-96. [Drinking water. Hygienic requirements for water quality of centralized drinking water supply systems. Quality control. methods MUK 4.2.671-97, developed by SanPiN 2.1.4.559-96.]

10. (2004). *Opređenje chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: Metodicheskie ukazanija* [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodological guidelines]. M.: Federal'nyj centr Gossanjepidnadzora Minzdrava Rossii [Moscow: Federal Center for State Sanitary Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health, 91 p.

11. Belavin, N. A., Dedkov, V. S., Degtjarev, S. H (1988) *Metod opredelenija jendonukleaz restrikcii v kolonijah bakterij* [Method of determination of restriction endonucleases in bacterial colonies]. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija* [Applied biochemistry and microbiology]. 24(1), pp. 129–132.

12. Degtjarev, S. H. Repin, V. E., Rechkunova, N. I., Netesova, N. A. (1987) *Ustanovlenie specifichnosti jendonukleazy restrikcii Vne I* [Establishment of the specificity of restriction endonuclease Vne I]. *Biorganicheskaja himija*, 13(3), pp. 422–423.

13. Amsharin, N. P., Vorob'ev A.A. (1962) *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovanijah* [Statistical methods in microbiological studies]. L.: Medgiz, 1962. 180 p.

14. Savilov, E. D. (2011). *Jepidemiologicheskij analiz: Metody statisticheskoi obrabotki materiala* [Epidemiological analysis: Methods of statistical processing of material]. Novosibirsk, Nauka-Centr., 156 p.

15. Kraemer H. (2006) *Correlation coefficients in medical research: from product moment correlation to the odds ratio. Statistical Methods in Medical research.* 15, pp. 525-544