

3
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Чибилёв А.А.

2018

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2018

УДК 579.262

Л.И. Черногор¹, С.И. Феранчук^{1 2}, Е.С. Клименко¹, И.В. Ханаев¹, С.И. Беликов¹

СКРИНИНГ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ АГЕНТОВ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ПРИММОРФ

¹ Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, Россия

² Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия

Цель работы. Идентификация патогенных агентов на клеточной культуре примморф с последующим определением их микробиомов в пораженных губках и экспериментально инфицированных клеточных культурах примморф.

Материалы и методы. Работа проведена с помощью морфологических методов и метагеномного секвенирования ампликонов 16S rRNA генов с биоинформационным анализом.

Результаты. Отмечалось снижение и гибель зеленых микроводорослей до полного их исчезновения и увеличение количества *Bacteroidetes* и *Proteobacteria*.

Заключение. В данной работе проведен поиск патогенного агента в больных губках с применением комплекса современных и классических методов, что позволит расширить представления о симбиотических взаимоотношениях в пресноводных губках.

Ключевые слова: клеточная культура примморф, симбионты, больные губки, микробиом, оппортунистические патогены, аннотация и ассемблирование данных.

L.I. Chernogor¹, S.I. Feranchuk^{1 2}, E.S. Klimenko¹, I.V. Khanaev¹, S.I. Belikov¹

PATHOGENIC AGENTS SCREENING AND IDENTIFICATION IN THE BAIKAL SPONGES USING THE CELL CULTURE OF PRIMMORPHS

¹ Limnological Institute of the SB of RAS, Irkutsk, Russia

² National Research Technical University, Irkutsk, Russia

Aim. Identification of pathogenic agents on the cell culture of primmorphs followed by the determination of their microbiomes in affected sponges and experimentally infected cell cultures of primmorphs.

Materials and methods. The work was carried out using morphological methods and metagenomics sequencing of amplicons of 16S rRNA genes with bioinformatics analysis.

Results. There was a decrease and death of green microalgae before their complete disappearance and an increase in the number of *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* phyla.

Conclusion. In this work, a search for a pathogenic agent in sponges with the use of a complex of modern and classical methods has been carried out, which will allow to expand our understanding of symbiotic relationships in freshwater sponges.

Key words: cell culture of primmorphs, symbionts, diseased sponges, microbiomes, opportunistic pathogens, annotation and assembling of data.

Введение

Работа посвящена проблеме массового поражения и гибели эндемичных байкальских губок, которая в дальнейшем может иметь катастрофические последствия для всего уникального биоразнообразия экосистемы озера

Байкал. Известно, что Байкал является эмблемой России и признан ЮНЕСКО объектом Всемирного наследия, назвавшей озеро «самым выдающимся примером пресноводной экосистемы».

Губки (тип *Porifera*) являются самыми древними фильтрующими многоклеточными животными, жившими более 635 млн. лет назад и существующими по настоящее время [1]. Известно, что симбионты губок могут составлять более 40-60% их объема и вносить значительный вклад в метаболизм хозяина [2]. Кроме того, губки занимают ключевое положение в глобальном функционировании водных экосистем и участвуют в фильтрации воды, рециклинге частиц, молекул, ионов и являются хорошим биоиндикатором состояния окружающей среды [3, 4].

Однако в последние годы во всем мире обсуждается актуальная проблема гибели морских губок и кораллов, которая наблюдается в Средиземном, Адриатическом, Карибском и других морях и океанах [3-6]. Существует не менее актуальная проблема массового заболевания и гибели байкальских пресноводных губок, которая возникла в 2011 г. с появлением в озере Байкал розовых губок. В настоящее время во многих районах озера выявлены больные губки *Lubomirskia baicalensis* и массовая гибель других видов эндемичных губок [7, 8]. Кроме того, отмечено крупномасштабное нарушение пространственного распределения и структуры фитоценозов прибрежной зоны озера Байкал [9]. Причины возникновения этих феноменов до сих пор не известны.

Байкальские губки (*Demospongiae*, *Lubomirskiidae*) – симбиотические животные, которые являются сложными консорциумами множества видов эукариот и прокариот [10]. Эти массовые, эндемичные животные очень важны для экосистемы озера Байкал и представляют собой хлорофилл-содержащие организмы, благодаря симбиозу с микроводорослями [11, 12]. Демоспонгии имеют различных симбионтов и доминируют в освещенной зоне, заселяя всю каменистую литораль озера, где образуют заросли на глубинах 5-30 метров. Ранее нами было показано, что внутриклеточные фотосинтезирующие зеленые водоросли *Mychonastes* sp., *Choricystis* sp. (*Chlorophyta*) занимают доминирующее положение в здоровых клеточных культурах губок *L. baicalensis* (Pallas, 1776) [10]. Кроме того, была получена длительно культивируемая *in vitro* клеточная культура губок – примморф [13].

Разработка модели передачи патогенных агентов в инфицированных губках требует детального изучения взаимодействий патоген-хозяин в окружающей среде. Однако в естественных условиях озера Байкал проведение таких экспериментов сложно, а порой и невозможно. Поэтому в данной работе мы применили клеточную культуру байкальской губки *L. baicalensis* для получения сравнительных данных о составе микробиомов больных и здоровых губок и экспериментального заражения клеточной культуры примморф.

Таким образом, целью данного исследования являлась идентификация микробиомов больных губок с помощью клеточной культуры примморф с последующим определением их составов на основе метагеномных и биоинформационных исследований.

Этот подход позволил нам осуществить выделение и идентификацию полученных изолятов с доказательством их патогенности для клеточной культуры губок. Полученные результаты расширят наши представления о симбиотических взаимоотношениях в эндемичных байкальских губках. В дальнейшем будет возможно предпринимать конкретные меры по защите экосистемы озера Байкал и сохранению этих гидробионтов.

Материалы и методы

Объектом наших исследований были пресноводные эндемичные байкальские губки *L. baicalensis* (рис. 1А и Б). Эта губка является хорошим модельным объектом для прикладных исследований, так как является фактически единственным видом байкальских губок, идентификация которых не вызывает сомнения (рис. 1А). Образцы внешне здоровых губок были собраны в районе Ольхонских ворот с глубины 10 м с помощью водолазного снаряжения.

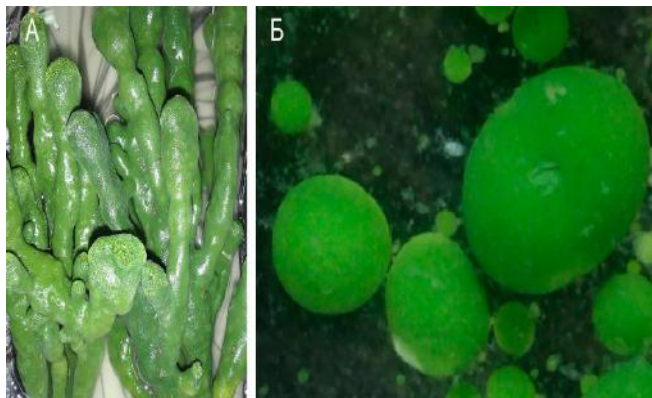


Рис. 1. *L. baicalensis*: А - здоровая губка и В - клеточная культура губок (примморф), полученная из этой губки.

Примморфы (рис. 1Б), размером 3-4 мм в диаметре получали путем механической диссоциацией клеток и с помощью модифицированного нами метода длительного культивирования [13].

Кроме того, были собраны образцы больных губок (рис. 2) с целью получения 10% клеточной суспензии для экспериментального заражения клеточной культуры здоровых примморф.



Рис. 2. Больная губка *L. baicalensis*, которая использовалась для получения клеточной суспензии при экспериментальном заражении здоровых примморф.

Клеточную культуру примморф размером 3-4 мм культивировали в 24-луночных планшетах (Nunc Multidish Nunclon Delta, TPP Nalge Nunc International, Rochester, NY) при температуре 3-6°C в условиях, максимально приближенных к природным (температура, вода, свет). В качестве среды применялась натуральная байкальская вода (НБВ), отобранная с глубины 500 м, пропущенная через стерилизующие фильтры и обработанная ультрафиолетом (патент РФ № 2045478). Примморфы заражали по 20 мкл клеточной суспензии от больных губок в 2 мл НБВ и культивировали при температуре 3-6°C. Наблюдения за ходом инфицирования велись *in vivo* в течение одного месяца с помощью световой и флуоресцентной (синий фильтр НВО 100, возбуждение 358/493 нм, излучение 463/520 нм) микроскопии с применением Axio Imager Z 2 microscope (Zeiss, Germany), а также с дальнейшим отбором проб для фиксации и выделения ДНК и последующей идентификацией их микробиомов. Окрашивание зараженных образцов клеточных культур проводили с помощью красителя NucBlue Live ReadyProbes (Invitrogen, USA).

Генетическое разнообразие в здоровых и зараженных клеточных культурах примморф, а также в больных и здоровых губках оценивали с помо-

щью массового параллельного секвенирования нового поколения (NGS) на платформе 454/Roche по протоколу GS Titanium. Геномную ДНК в трех повторях экстрагировали от 10 до 30 мг ткани губки или по 3 примморф, используя TRIzol LS реагент (Invitrogen, Ambion, США) в соответствии с инструкциями производителя. В каждый эксперимент брали по три примморфы в трех повторностях, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с набором Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия). Реакцию осуществляли в автоматическом амплификаторе Бис М-111 (ООО «БИС-Н», Россия). Универсальные бактериальные праймеры 518F и 1064R [14] использовали для амплификации с помощью ПЦР гипервариабельной V4-V6 области бактериального гена 16S rRNA по программе: 3 мин. при 96°C; 30 циклов из 94° С в течение 20 сек., 55°C в течение 20 сек. и 72°C в течение 1 мин. с конечной 10-минутной инкубацией при 55°C. Метагеномное секвенирование ампликонов выполнено с ДНК из трех повторных ПЦР-реакций.

Полученные образцы обрабатывались с использованием QIIME pipeline для сбора операционных таксономических единиц (OTU) с открытой ссылкой [15, 16]. Оценки биоразнообразия были обработаны в соответствии с методами, описанными ранее [17]. Пользовательские сценарии Python и JavaScript с использованием пакета scikit-bio и библиотеки JavaScript d3 были использованы для анализа данных в нисходящем направлении. Ключевым моментом обработки, с помощью методов биоинформатики была попытка обнаружить возможные бактериальные возбудители, которые вызывают заболевания в губках. Для тщательной обработки данных секвенирования был разработан дополнительный конвейер для сбора OTU с открытой ссылкой. Базы данных Silva были использованы для генерации и аннотирования таксонов. Кластеризация сиквенсов с $\geq 97\%$ гомологии проведена, согласно рекомендациям У. Не et al. [18]. В дополнительном конвейере использовался алгоритм поиска [19] с порогом идентификации 90%, а затем была проведена полная кластеризация связей.

Результаты и обсуждение

Для сравнения в качестве здоровых контрольных образцов брались губки 2010, 2011, 2015 гг. и примморфы, которые были получены из этой же губки 2015 г. В последующем эти примморфы являлись экспериментальными образцами для заражения суспензией клеток от больной губки. Так, в здоровой, не зараженной клеточной культуре примморф был отмечен активный

рост симбиотических водорослей, при микроскопии выявлена ярко-красная активная автофлуоресценция хлорофилла, клеток микроводорослей, при возбуждении синим светом (рис. 3 А и Б). При экспериментальном заражении клеточных культур суспензиями клеток больной губки выявлено, что приморфы теряли свой прежний ярко-зелёный цвет на 3-4 день во всех образцах, в дальнейшем отмечалось их обесцвечивание, что связано с гибелью зеленых внутриклеточных симбионтов – водорослей. Кроме того, в культуре отмечался грязный налет, зловонный запах и образование бактериальных пленок. При дальнейшем культивировании в течение месяца во всех экспериментальных образцах отмечалась гибель зеленых внутриклеточных симбионтов с потерей хлорофилла, наблюдалось интенсивное нарастание биомассы бактерий с последующим расплавлением тканей и клеток губки, и резким увеличением биомассы различных бактерий (рис. 3 В и Г).

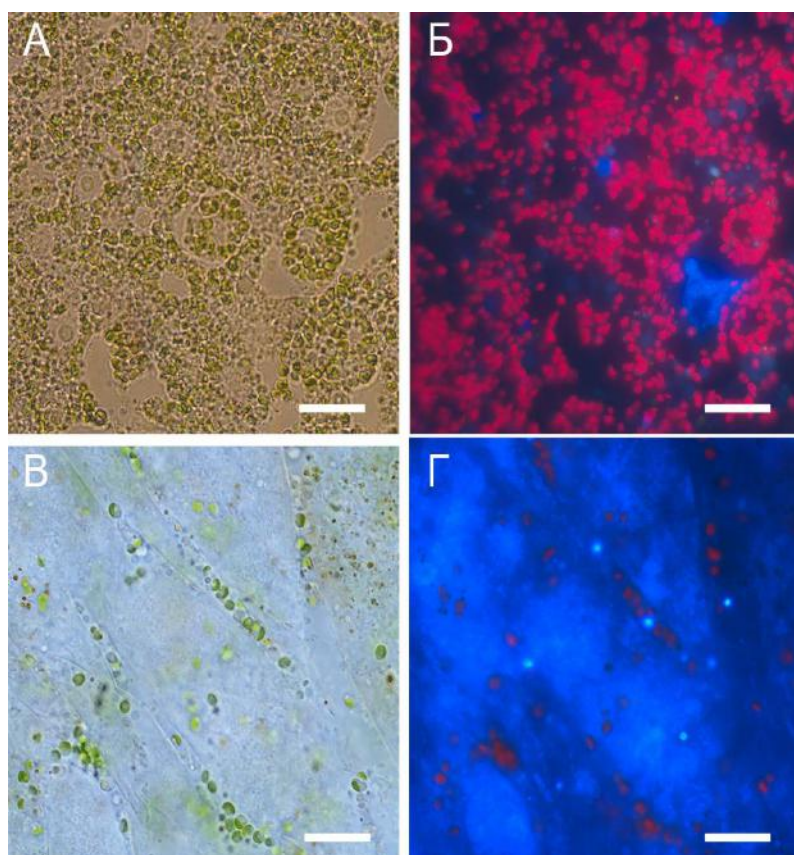


Рис. 3. А - световая микроскопия здоровой, не зараженной клеточной культуры приморф, культивированная в течении 1 месяца, Б – эта культура в ультрафиолете; красным цветом отмечена ярко-красная автофлуоресценция зеленых симбионтов. В, Г – культура приморф, зараженная суспензией клеток от больной губки через 14 дней. Красным цветом отмечены единичные зеленые симбионты, синим цветом – биомасса бактерий. Размер 10 мкм.

Для более детального анализа был оценен состав микробиомов микроорганизмов и фотосинтетических водорослей (эукариот и прокариот) в здоровых и больных губках и клеточных культурах примморф (здоровых и зараженных) с последующим биоинформационным анализом данных. На гистограмме показано обилие филы *Cyanobacteria/Chloroplast* и бактериальных фил, наблюдаемых в исследованных образцах, (рис. 4).

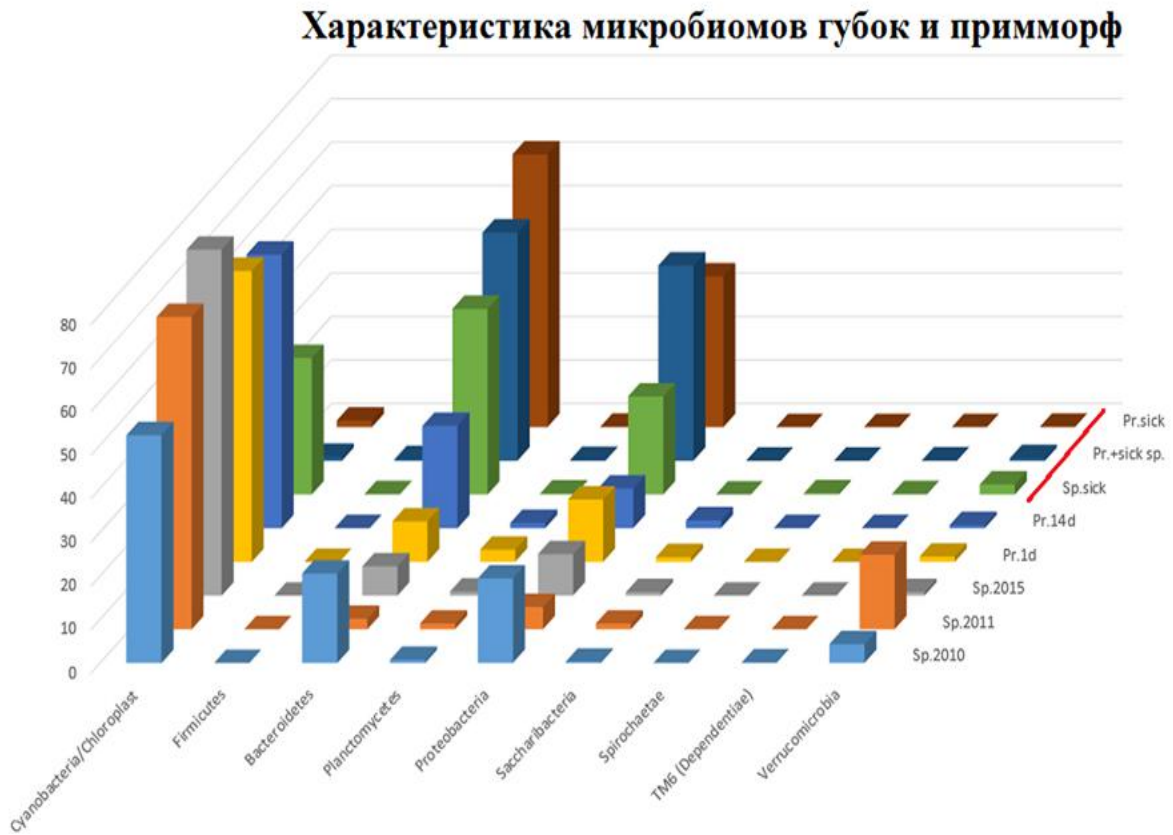


Рис. 4. Микробиомы больных и здоровых губок и клеточной культуры примморф.

Условные обозначения: Sp. 2010 - здоровые губки 2010 года; Sp. 2011 - здоровые губки 2011 года; Sp. 2015 - здоровые губки 2015 года; Pr. 1d – здоровые примморфы 1 день культивирования; Pr. 14d – здоровые примморфы 14 день культивирования; Sp.sick – больная губка 2015 года; Pr. + sick sp. – примморфы экспериментально зараженные суспензией клеток больной губкой 2015 года; Pr. sick – больные примморфы. Показана относительная численность доминирующих бактериальных фил в исследуемых образцах в процентах. Обилие фил нанесено на ось Y. Филы, показывающие <0,1% относительной численности, не рассматриваются.

Так, в здоровых образцах губок, выделенных в 2010, 2011, 2015 гг., и не инфицированных клеточных культурах примморф по результатам анализа 16S rRNA отмечалось доминирование хлоропласта (до 85%) и незначительное количество *Cyanobacteria* (до 5%). Основным симбионтом губки являлась зеленая микроводоросль *Choricystis* sp., которая детектируется по после-

довательности гена 16S rRNA хлоропласта и попадает в кластер *Cyanobacteria*. Известно, что в здоровых байкальских губках и культурах примморф присутствуют зеленые микроводоросли, содержащие один хлоропласт на клетку, которые относятся к эукариотическим симбионтам губки. Кроме того, ранее нами было показано, что и в здоровых губках, и примморфах доминирующими зелеными симбионтами являются фотосинтетические водоросли *Mychonastes* sp. и *Choricystis* sp. (Chlorophyta) [10]. Было показано, что одноклеточные эукариоты, входящие в сложные симбиотические сообщества байкальских губок, продуцируют значительную долю хлорофилла, жирных кислот и других вторичных метаболитов [11, 12], тогда как содержание бактериальных симбионтов составляет: *Proteobacteria* 9.5%, *Bacteroidetes* 6.7%, *Actinobacteria* 2.1%, *Planctomycetes* 0.9%, *Saccharibacteria* 0.8% и *Verrucomicrobia* 0.9%.

Совершенно другая картина отмечается в больных губках и инфицированных примморфах, суспензиями клеток от этих губок. В образцах отмечается резкое снижение содержания хлоропластной ДНК и существенно увеличивается количество бактерий фил *Bacteroidetes* (42.6-61%) и *Proteobacteria* (22.5-15.8%). Среди фил *Bacteroidetes* и *Proteobacteria* доминируют роды *Flavobacterium* до 59% и *Betaproteobacteria* до 27%, соответственно. Среди *Betaproteobacteria* отмечаются группы порядка *Burkholderiales*, семейства *Comamonadaceae* и *Oxalobacteraceae*, которые в клеточных культурах экспериментально зараженных примморф увеличились до 10,2 и 7,4%, что соответствует микробиомам больных губок. Кроме того, отмечалось увеличение *Undibacterium*, *Rhizobacter*, *Polaromonas*, *Albidiferax* до 5,0 и 10,0%, соответственно, которые не были идентифицированы в здоровых губках и примморфах. Среди *Gamma proteobacteria* отмечается рост (до 25,4%) бактерий семейства *Moraxellaceae* в инфицированных культурах примморф, тогда как филы *Planctomycetes* и *Actinobacteria* представлены в качестве минорных компонентов. Кроме того, не было обнаружено *Verrucomicrobia* (LD 19) в здоровых и больных губках 2015 г. и в культурах примморф, которые отмечались ранее в образцах губок в 2010, 2011 г.

Все оценки биоразнообразия были выражены с использованием показателей Шеннона, Симпсона и Джини, и отражают разницу между здоровыми и больными образцами. Индекс Шеннона для здоровых образцов варьирует в пределах 1,5-2,5, а для больных образцов от 3,5 до 5 (р-значение <0,005) из-за

высокого содержания хлоропластов в здоровых образцах. Индекс Фишера использовался, как оценка разнесения ($P = 0,03$ на уровне семейств).

Подробный биоинформационный анализ позволяет определить конкретные роды и семейства бактерий до операционной таксономической единицы (OTU), которые были идентифицированы для больных губок. Однако гетерогенность распределения этих бактерий в инфицированных образцах примморф, а также наличие небольших количеств таксономически сходных бактерий в образцах здоровой губки в 2010 г. не позволили нам идентифицировать только один тип бактерий, который является причиной заболевания губки. В результате анализа микробиомов больных губок и инфицированных примморф было выявлено множество патогенных агентов. Известно, что в облигатных симбиотических системах, в частности в губках, члены микробного сообщества очень специализированы и тесно взаимосвязаны [20, 21], поэтому утрата даже одного из видов, часто не позволяет компенсировать потерю и замену функционально эквивалентными видами [22]. Появление разлагающихся тканей является весьма характерным признаком заболевания, что свидетельствует о паразитическом способе питания представителей многих бактериальных семейств. Значительное уменьшение в больных губках по сравнению со здоровыми, представителей фил *Actinobacteria* (0.3 и 11.4%), а также фило типа *Methylothera* (<0.01 и 1.0%, соответственно), очевидно, может служить примером нарушения метаболических связей между симбионтами губки. Известно, что микроорганизмы, как полезные, так и вредные, в процессе эволюции развили важную роль в губках [23]. Таким образом, наблюдаемый дисбаланс в исследуемых микробных сообществах больных губок и инфицированных культурах примморф может быть вызван несколькими различными оппортунистическими патогенами, что, в итоге, приводит к полной гибели зеленых эукариотических, фотосинтетических микроводорослей (*Chlorophyta*). Природа связи между зелеными микроводорослями и бактериальными патогенами пока не выяснена и требует проведения дополнительных исследований.

Заключение

Нами разработана удобная экспериментальная клеточная культура примморф для исследования передачи патогенных агентов от больных губок для изучения взаимодействий патоген-хозяин в окружающей среде. В больных губках и зараженных культурах примморф показаны сложные симбио-

тические изменения, связанные с массовой гибелью зеленых эукариотических симбионтов, а также резкое увеличение представителей различных бактериальных групп, которые проявляют себя как коинфекции с несколькими различными оппортунистическими патогенами, повышающими эффективность заболевания. Описанная модельная система примморф, применимая для изучения основных механизмов развития болезни губки, будет полезна в будущих исследованиях. В данной работе проведен поиск патогенного агента в больных губках с применением комплекса современных и классических методов, что позволит расширить представления о симбиотических взаимоотношениях в пресноводных губках, а также позволит внедрить научные рекомендации по сохранению уникальных пресноводных губок озера Байкала.

(Исследование финансировалось по бюджетному проекту ФАНО России № 0345-2016-0002 и грантам РФФИ, № 16-04-00065, 16-54-150007, 18-04-00224).

Авторы благодарны за помощь в работе ЦКП Национального научного центра морской биологии ДВО РАН (Институт морской биологии им. А.В. Жирмунского).

ЛИТЕРАТУРА

1. Love G.D., Grosjean E., Stalvies C. et al. Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature*. 2009. 457 (7230): 718-721.
2. Bayer K., Schmitt S., Hentschel U. Microbial nitrification in Mediterranean sponges: possible involvement of ammonium-oxidizing Betaproteobacteria. In: Muricy G (ed) *Porifera Research: biodiversity, innovation, sustainability*. Série Livros. Museu Nacional, Rio de Janeiro, 2007: 165-171.
3. Wulff J.L. Disease prevalence and population density over time in three common Caribbean coral reef sponge species. *J Mar Biol Assoc*. 2007. 87: 1715-1720.
4. Webster N.S. Sponge disease: a global threat? *Environ Microbiol*. 2007. 9 (6): 1363-1375.
5. Olson J.B., Gochfeld D.J., Slattery M. *Aplysina* red band syndrome: a new threat to Caribbean sponges. *Dis Aquat Organ*. 2006. 71(2):163-168.
6. Stabili L., Cardone F., Alifano P. et al. Epidemic mortality of the sponge *Ircinia variabilis* (Schmidt, 1862) associated to proliferation of a *Vibrio* bacterium. *Microb Ecol*. 2012. 64 (3): 802-813.
7. Kravtsova L.S., Izhboldina L.A., Khanaev I.V. et al. Nearshore benthic blooms of filamentous green algae in Lake Baikal. *J Great Lakes Res*. 2014. 40 (1): 441-48.
8. Khanaev I.V., Kravtsova L.S., Maikova O.O., et al. Current state of the sponge fauna (Porifera: Lubomirskiidae) of Lake Baikal: sponge disease and the problem of conservation of diversity. *J Great Lakes Res*. 2018. 44 (1): 77-85.
9. Timoshkin O.A., Samsonov D.P., Yamamuro M. et al. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? *J Great Lakes Res*. 2016. 42 (3): 487-97.
10. Chernogor L., Denikina N., Kondratov I. et al. Isolation and identification of microalgal symbiont from the primmorphs of endemic freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1773) (Lubomirskiidae: Haplosclerida: Demospongiae: Porifera). *European Journal of Phycology*. 2013. 48 (4): 497-508.
11. Latyshev N.A., Zhukova N.V., Efremova S.M. Effect of habitat on participation of symbionts in formation of the fatty acid pool of freshwater sponges of Lake Baikal. *Comp Biochem Physiol*. 1992. 102B: 961-965.
12. Bil K., Titlyanov E., Berner T. et al. Some aspects of the physiology and biochemistry of

- Lubomirska baicalensis, a sponge from Lake Baikal containing symbiotic algae. *Symbiosis*. 26: 179-191.
13. Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I. Long-term cultivation of primmorphs from freshwater Baikal sponges *Lubomirskia baicalensis*. *Mar Biotechnol*. 2011. 13 (4): 782-92.
 14. Klindworth A., Pruesse E., Schweer T. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids*. 2013. 7: 41(1):e1. [https://doi: 10.1093/nar/gks808](https://doi.org/10.1093/nar/gks808).
 15. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010. 7 (5): 335-336.
 16. Kopylova E., Navas-Molina J.A., Mercier C., et al. Open-source sequence clustering methods improve the state of the art. *mSystems*. 2016. 9;1(1). pii: e00003-15 [https://doi: 10.1128/mSystems.00003-15](https://doi.org/10.1128/mSystems.00003-15)
 17. Feranchuk S., Belkova N., Potapova U. et al. Evaluating the use of diversity indices to distinguish between microbial communities with different traits. *Res Microbiol*. 2018. 169 (4-5): 254-261.
 18. He Y., Caporaso J.G., Jiang X.T. et al. Stability of operational taxonomic units: an important but neglected property for analyzing microbial diversity. *Microbiome*. 2015. 3: 20. DOI: 10.1186/s40168-015-0081-x.
 19. Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010. 26 (19): 2460-2461.
 20. Thomas T., Rusch D., Demaere M.Z. et al. Functional genomic signatures of sponge bacteria reveal unique and shared features of symbiosis. *ISME J*. 2010. 49 (12): 1557-1567.
 21. Fan L., Reynolds D., Liu M. et al. Functional equivalence and evolutionary convergence in complex communities of microbial sponge symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. 109 (27): E1878-87.
 22. Mao-Jones J., Ritchie K.B., Jones L.E. et al. How microbial community composition regulates coral disease development. *PLoS Biol*. 2010. 8: e1000345.
 23. Taylor M.W., Radax R., Steger D. et al. Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007. 71 (2): 295-347.

Получена 07.09.2018

(Контактная информация: Черногор Любовь Ивановна – кандидат биологических наук, научный сотрудник Лимнологического института СО РАН; адрес: 664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, д. 3; тел: 893952511874; e-mail: lchernogor@mail.ru)

Образец ссылки на статью:

Черногор Л.И., Феранчук С.И., Клименко Е.С., Ханаев И.В., Беликов С.И. Скрининг и идентификация патогенных агентов байкальских губок с помощью клеточной культуры примморф. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2018. 3: 11 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/LIC-2018-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2018-13001.