

Автохтонные бактериофаги в структуре “микробной петли” различных биотопов озера Байкал

В. В. ДРЮККЕР¹, О. И. БЕЛЫХ¹, А. С. ГОРШКОВА¹, А. А. БОНДАРЬ², Н. Н. СЫКИЛИНДА³

¹ Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
E-mail: drucker@lin.irk.ru

² ЦКП “Геномика” Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8
E-mail: alex.bondar@mail.ru

³ Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина
и акад. Ю. А. Овчинникова РАН
117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
E-mail: sykilinda@mail.ru

Статья поступила 16.04.2018

После доработки 18.09.2018

Принята к печати 21.09.2018

АННОТАЦИЯ

В статье представлены результаты изучения автохтонных бактериофагов – ранее неизвестного звена в структуре “микробной петли” экосистемы глубоководного олиготрофного оз. Байкал. Методом трансмиссионной электронной микроскопии исследовано морфологическое разнообразие фагов водной толщи, поверхностного микрослоя воды и бентосных биопленок, образовавшихся на границе вода – геологические породы (мрамор, гранит, слюда, кварц, амфиболит, габбро, уртит). Представлены данные по размерной структуре автохтонных бактериофагов, их численности, сезонной динамике и вертикальному распределению от поверхности до максимальных глубин – 1200 м в сравнении с содержанием бактерий. Выделены и охарактеризованы молекулярно-генетическими методами несколько морфотипов байкальских автохтонных бактериофагов, поражающих *Pseudomonas aeruginosa*. Определены полные геномы гигантского фага PaBG семейства *Myoviridae* и фага MD8 семейства *Siphoviridae*.

Ключевые слова: бактериофаги, Байкал, морфотипы, численность, планктон, нейстон, биопленки.

Изучение функционирования экосистемы самого крупного – объем водной массы 23,6 тыс. км³, самого древнего – 25–30 млн лет и самого глубокого – 1642 м олиготрофного озера мира – Байкала имеет приоритетное

научное и практическое значение, так как в нем содержится 20 % всей пресной воды на Земле. Исследование роли каждого компонента в структуре экосистемы озера и процессах трансформации энергии внутри биотиче-

ского сообщества необходимо для адекватного количественного описания потоков энергии в целом, а также для оценки данной экосистемы с точки зрения ее эффективности.

Микробная трофическая сеть (“микробная петля”), включающая мельчайшие водоросли, цианобактерии, гетеротрофные бактерии, флагоеллы, инфузории и др., является важным компонентом планктонных сообществ и выполняет функцию промежуточного звена в трансформации органического вещества от автотрофных организмов к метазойному планктону. Для водоемов различного трофического статуса важно знать, как микроорганизмы осуществляют быстрый рециклинг биогенных веществ и удерживают их внутри планктонного сообщества, что позволяет бактерио- и фитопланктону многократно использовать биогенные элементы. Для оз. Байкал большое практическое значение имеет проблема сохранения воды высокого качества, разработка конкретных мероприятий по предотвращению загрязнения озера. В решении этих задач значительную роль играют исследования структуры и функционирования микробного населения уникального озера в современный период глобального потепления.

В последние десятилетия в воде морей и океанов установлена высокая концентрация вирусных частиц, до 10^8 частиц/мл, которая значительно превышает численность всех других составляющих планктонного сообщества [Bergh et al., 1989; Bratback et al., 1990; Fuhrman, 1999; Wommack, Collwel, 2000; Weinbauer, 2004]. Выяснено, что автохтонные бактериофаги (фаги) – вирусы бактерий – играют в морских экосистемах ключевую роль в регулировании численности и структуры бактериальных сообществ, принимая активное участие в биогеохимических циклах [Proctor, Fuhrman, 1990; Wilhelm, Suttle, 1999; Noble, Fuhrman, 1999; Weitz, Wilhelm, 2012]. Велико их значение в изменчивости, видообразовании и эволюции прокариот, так как они способны осуществлять горизонтальный перенос генов от одного хозяина к другому. Не только бактериофаги, но и вирусы эукариот относятся к числу наиболее мощных биологических факторов, контролирующих разнообразие и численность хозяев, а также продуктивность водных экосистем.

Вирусная инфекция морского фитопланктона приводит к 78%-й редукции первичной продукции, ежедневно в морях и океанах лизируется около 20 % микробной биомассы [Suttle et al., 1990; Wommack, Collwel, 2000]. Показано, что 10^{23} бактерий инфицируется фагами каждую секунду [Hendrix, 2003]. Посредством вирусного лизиса из отмерших клеток высвобождается растворенное и взвешенное органическое вещество, которое снова может использоваться бактериями. В результате так называемого явления “вирусного шунта” в “микробной петле” происходит отклонение части потока органического вещества от направления вверх по пищевой цепи к основанию пищевой пирамиды [Fuhrman, 1999; Wilhelm, Suttle, 1999; Suttle, 2005; Weitz, Wilhelm, 2012]. Проведенные в этой области исследования позволяют считать водные вирусы важным компонентом “микробной петли”, вносящим существенный вклад в функционирование своих хозяев – бактерий, водорослей, простейших. Эти новые знания о роли вирусов в циркуляции органического углерода и других элементов в Мировом океане изменили сложившиеся представления о структуре и функционировании “микробной петли” водных экосистем.

Применение трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) для изучения вириопланктона позволило получить наиболее точное представление о морфологии и численности водных вирусов [Bergh et al., 1989; Børshiem et al., 1990; Bratback et al., 1990]. Электронная микроскопия и до настоящего времени остается основным инструментом в изучении экологии фагов водных экосистем, несмотря на широкое распространение таких методов, как эпифлуоресцентная микроскопия [Noble, Fuhrman, 1998], проточная цитометрия [Brussaard et al., 2000], метагеномный анализ [Brum, Sullivan, 2015]. Показано, что среди водных вирусов доминируют преимущественно бактериофаги с типичной “фаговой” морфологией – хвостатые (порядок Caudovirales), которые отличаются изометрической головкой и хвостовым отростком [Wommack et al., 1992; Weinbauer, 2004]. Кроме того, выявлены разнообразные морфотипы вирусов: кубические, веретенообразные, нитчатые и плеоморфные, а также с

различными дополнительными структурными образованиями на поверхности капсида [Børshøj, 1993; Ackermann, 2001]. Диаметр капсида и размер генома вирусов могут различаться больше чем на порядок, а морфологически различные формы иметь сходный размер генома [Weinbauer, 2004; Holmfeldt et al., 2007]. В этой связи выделение вирусов, морфологическое описание и молекулярно-генетический анализ изолятов открывают широкие возможности для наиболее детального изучения природы бактериофагов, в том числе и для исследований взаимоотношений фаг – хозяин.

Разнообразие вирусов, структура и динамика вирусных сообществ в водных экосистемах все еще недостаточно хорошо изучены, несмотря на комплекс применяемых методов и подходов. Большинство опубликованных работ по водным вирусам, в том числе и бактериофагам, относятся к морским и океаническим экосистемам, и в меньшей степени касаются пресных водоемов и водотоков [Mathias et al., 1995; Sulcius et al., 2011; Копылов и др., 2013, 2016а, б]. Благодаря подходу, основанному на таксономической идентификации вирусов и структурировании их сообществ с использованием морфологических и ультраструктурных признаков [Wommack et al., 1992; Weinbauer, Peduzzi, 1994; Wichels et al., 1998], выявлены разнообразие вирусов, их обилие, размерная структура и распределение в ряде пресных водоемов [Demuth et al., 1993; Mathias et al., 1995; Harper, Hicks, 1998; Сироткин и др., 2001; Hofer, Sommaruga, 2001; Sulcius et al., 2011]. Подобные исследования являются особо актуальными для малоизученных пресноводных экосистем. Следовательно, необходимо дальнейшее выяснение и уточнение представлений о структурно-функциональной организации вирусных сообществ в трофической цепи различных водных экосистем.

Исследование фагов в оз. Байкал и его притоках начаты в 1997 г. [Дрюккер, Масленников, 1998]. В дальнейшем, с использованием методов фильтрации, центрифугирования и трансмиссионной электронной микроскопии впервые проведен поиск и изучение морфологического разнообразия, размерной структуры, общей численности автохтонных

бактериофагов водной толщи самого древнего и глубокого озера мира [Дрюккер, Дутова, 2003, 2006, 2009; Дутова, Дрюккер, 2013]. В последнее время детально изучено генетическое разнообразие бактериофагов семейства *Mioviridae* в планктоне и в эндемичных губках оз. Байкал с помощью специфических маркеров к генам, кодирующим капсидные белки [Butina et al., 2010; Бутина и др., 2015; Potapov et al., 2017].

Цель настоящей работы – выяснить морфологию, таксономическое разнообразие, генетические особенности, численность, сезонную динамику и распространение автохтонных бактериофагов в различных биотопах оз. Байкал.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Отбор проб проводили в литорали и пелагиали оз. Байкал в весенний (май), летний (июль – август), осенний (сентябрь – октябрь) и зимний (февраль – март) периоды в 2004–2015 гг. (рис. 1). В литоральной зоне пробы планктона отбирали у пос. Листвянка (51°51,65' с. ш., 104°50,20' в. д.) с глубин 0,25 и 0,5 м, в пелагиали – на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой (51°42' с. ш., 105° в. д.) с поверхности и на глубинах 25, 250, 500, 1000 и 1200 м – батометрами в стерильные стеклянные флаконы. Пробы нейстона брали из поверхностного микрослоя воды по всей акватории озера стерильной металлической сеткой в штилевую погоду, как описано [Galachyants et al., 2016]. Бентосные пробы отбирали в литоральной зоне на глубине трех метров из биопленок, сформированных на пластинах гранита, мрамора, слюды, кварца, амфиболита, габбро, уртита (наиболее распространенные в береговой зоне горные породы) в условиях природного эксперимента, продолжавшегося в течение пяти лет в районе полигона “Березовый” в Южном Байкале [Парфенова и др., 2013]. Образцы биопленок брали с площади 12 см² и суспендировали в 50 мл стерильной воды.

Для электронно-микроскопического изучения пробы осаждали с помощью ультрацентрифуг Beckman-L8-55 (Beckman Instruments, США) и Sorvall Discovery-96 SE (Thermo

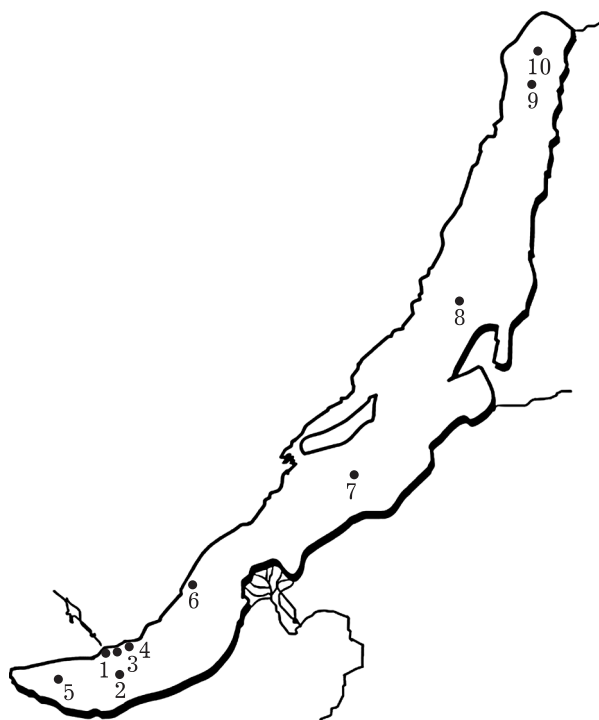


Рис. 1. Станции отбора проб планктона, нейстона и бентоса в оз. Байкал: 1 – пос. Листвянка, 2 – центральная станция разреза пос. Листвянка – пос. Танхой, 3 – мыс Березовый, 4 – пос. Бол. Коты, 5 – центральная станция разреза пос. Маритуй – пос. Солзан, 6 – бухта Песчаная, 7 – центральная станция разреза мыс Ухан – мыс Тонкий, 8 – центральная станция разреза мыс Заворотный – р. Сосновка, 9 – центральная станция разреза с. Байкальское – мыс Турали, 10 – центральная станция разреза р. Тья – мыс Немнянка

Fisher Scientific) при скорости 100 000 об/мин в течение 1,5–2 ч. Осадок ресуспендировали в 1,5 мл стерильной воды, суспензию в количестве 2 мкл наносили на медные сетки, покрытые формвар-углеродной подложкой, высушивали на воздухе и контрастировали 1%-м раствором фосфовольфрамовой кислоты в течение трех минут. Из каждой пробы готовили по две сетки, на которых учитывали фаговые частицы различных морфологических групп в 100 полях зрения, подсчет численности проводили в двух повторностях [Zheng et al., 1996]. Препараты бактериофагов наблюдали в трансмиссионном электронном микроскопе LEO-906 E (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении $\times 40\,000$ – $70\,000$.

Общую численность бактерий определяли на поликарбонатных фильтрах с диаметром

пор 0,22 мкм в эпифлуоресцентном микроскопе Olympus BX51 (Olympus Corporation, Япония) с использованием красителя DAPI (Biotium, США) [Porter, Feig, 1980]. Идентификацию бактериофагов проводили по морфологическим признакам согласно классификации [Ackermann, 2001]. Всего за весь период исследований найдено и классифицировано более 3000 бактериофагов. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью Microsoft Excel (2010).

Для выделения фагов штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 использовали общепринятый принцип “накопительных” культур. Для этого 3 мл воды из оз. Байкал смешивали с 1 мл 4-кратной жидкой среды LB и 50 мкл экспоненциально растущей культуры *P. aeruginosa*. Культивировали в течение 24 ч при 37 °C. Аликвоту накопительной культуры объемом 1 мл центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость объемом 10 мкл наносили на “газон” клеток *P. aeruginosa*, подготовленный стандартным методом. После культивирования при 37 °C в течение 24 ч наблюдали наличие прозрачных зон лизиса. В качестве контроля использовали культуру *P. aeruginosa* без добавления природного образца. Бляшки фагов в количестве 1–2 шт. отбирали в пробирки с 20 мкл физиологического раствора, экстрагировали один час при +4 °C и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость фильтровали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Фильтрат наносили на сетки, покрытые формвар-углеродной подложкой, контрастировали 2%-м водным раствором уранил ацетата в течение 15 мин, высушивали и наблюдали в электронный микроскоп.

Очистку фагов в градиенте CsCl и выделение ДНК проводили согласно методическому руководству для фага λ [Маниатис и др., 1984]. Рестрикционный анализ выполняли с ферментами BamH1, Hind3, Nde1, Nhe1, Sal1, Pst1 согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Реакция шла при 37 °C в течение 4 ч, после чего проводили агарозный гель-электрофорез. Определение полных геномов фагов PaBG и MD8, инфицирующих *P. aeruginosa* PAO1, выполняли с помощью методов высокопроиз-

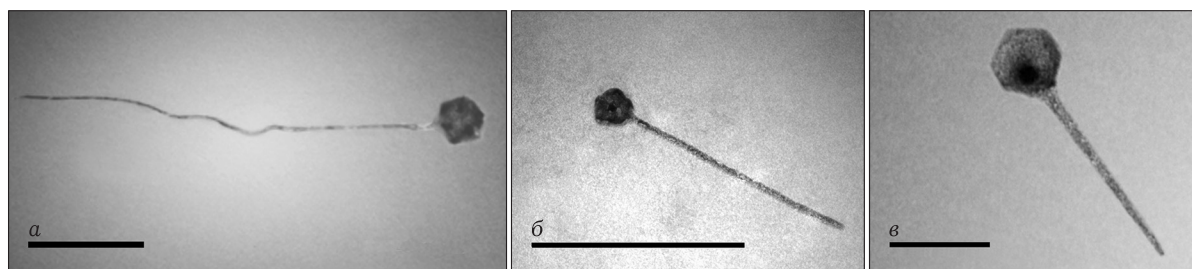


Рис. 2. Бактериофаги семейства Siphoviridae. Трансмиссионная электронная микроскопия. Масштаб: а – 200 нм, б – 500 нм, в – 100 нм

водительного секвенирования (MiSeq, Illumina), как описано ранее [Sykilinda et al., 2014]. Нуклеотидные последовательности фагов PaBG и MD8 депонированы в GenBank под номерами KF147891 и KX198612 соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В воде оз. Байкал впервые установлено большое морфологическое и таксономическое разнообразие автохтонных бактериофагов. Большинство найденных фагов (76 %) принадлежали отряду Caudovirales – хвостатых фагов с икосаэдрическими головками, объединяющему в зависимости от размеров и сократимости хвостовых отростков три семейства: Siphoviridae, Podoviridae, Myoviridae. Среди них преобладали фаги (40–59 %) с

длинными несократимыми хвостовыми отростками, представляющими семейство Siphoviridae (морфотипы B₁, B₂, B₃) (рис. 2, а–в). Это фаги с различной формой капсида, размер которого варьировал в пределах 20–254 нм, длина отростка составляла 45–780 нм. Следующими по встречаемости (11–32 %) оказались бактериофаги семейства Podoviridae (морфотипы C₁, C₂). Характерная особенность представителей этого семейства – наличие короткого несократимого хвоста без базальной пластинки, отходящего от одной из вершин многогранной головки (рис. 3, а–в). Размер капсида составил 40–73 нм, длина хвостового отростка – 8–29 нм. Бактериофаги семейства Myoviridae (морфотипы A₁, A₂) имели размер капсида 69–143 нм, длину хвостовых отростков – 25–326 нм, длину чех-

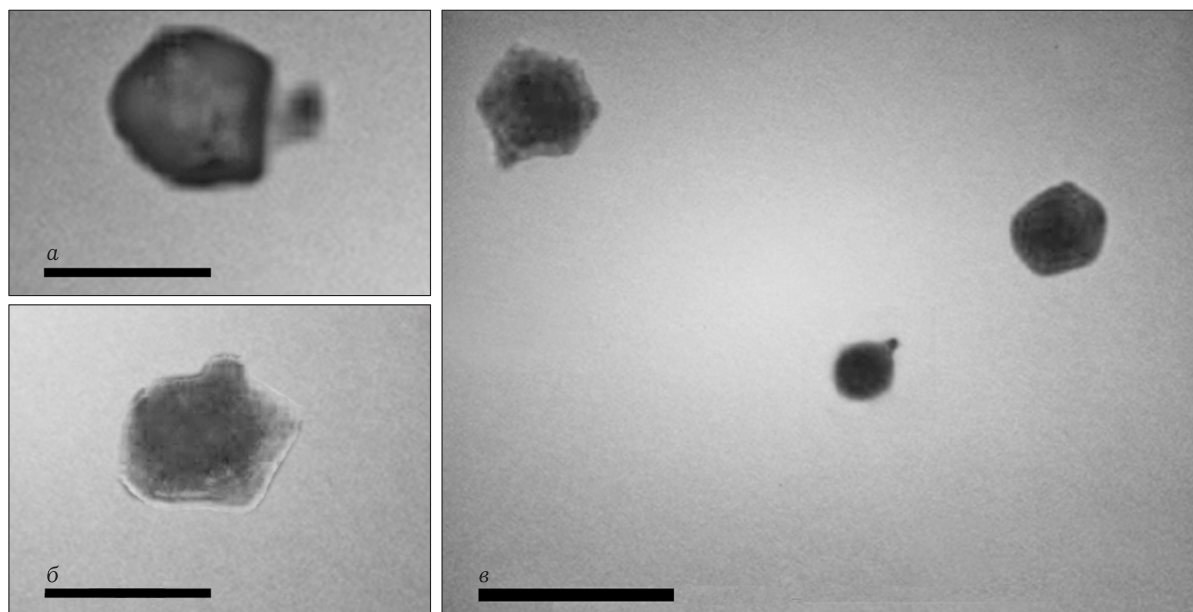


Рис. 3. Бактериофаги семейства Podoviridae. Трансмиссионная электронная микроскопия. Масштаб: а, б – 50 нм, в – 100 нм

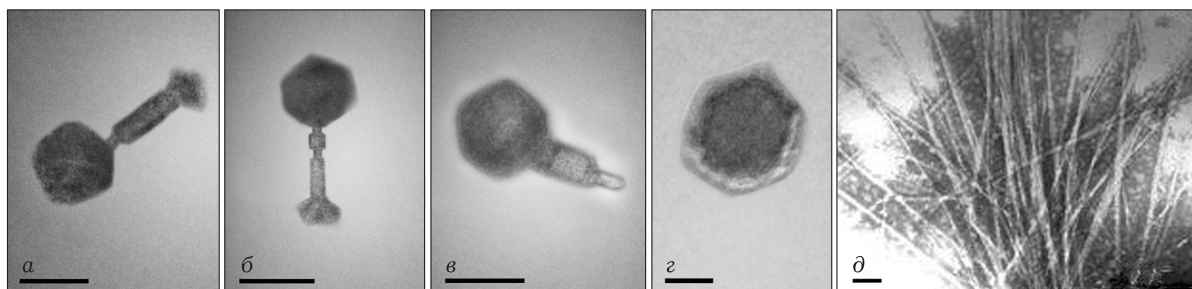


Рис. 4. Бактериофаги семейств Myoviridae (a–в), Microviridae (г) и Inoviridae (д). Трансмиссионная электронная микроскопия. Масштаб: a–в – 100 нм, г – 50 нм, д – 500 нм

лов – 15–121 нм, их доля в планктоне озера достигала 6–25 %. Миовирусы отличались сложной структурной организацией сократимого хвостового отростка. Базальная пластинка большинства фагов снабжена разного рода структурами: зубцеобразными, войлочными придатками и шаровидными телами на конце отростков (рис. 4, a–в).

В вириопланктоне оз. Байкал в небольшом количестве встречались фаги семейств Microviridae (см. рис. 4, г), Inoviridae (нитчатые) (см. рис. 4, д) и Leviviridae. У представителей семейств Microviridae и Leviviridae отсутствует хвостовой отросток, характерный для большинства автохтонных вирусных частиц. Они имели икосаэдрическую форму капсида и малые размеры (36–42 нм) и отличались от других типов своей однородностью как по размерам, так и по форме. Также найдены крупные фаги без хвостового отростка размером 110–160 нм с двумя четко выраженными оболочками.

Особый интерес представляют обнаруженные в оз. Байкал морфотипы бактериофагов, которые не представлены в международной системе по таксономии вирусов (ICTV) и не описаны авторами для других водных экосистем (возможно, “эндемичные”). Так, в летний период найдены вирионы с головкой в форме “юлы” (рис. 5, а). Особенностью морфологии других фагов является наличие шиповидных выростов длиной около 7 нм, радиально отходящих от капсида (см. рис. 5, б). Кроме того, найдены фаги с двумя четко дифференцированными оболочками и толстым хвостовым отростком (см. рис. 5, в, г), в форме “молотка” с вытянутой головкой перпендикулярно хвосту (см. рис. 5, д).

Морфологические исследования вириопланктона поверхностных вод других водных

экосистем мира также указывают на преимущественное распространение в них бактериофагов отряда Caudovirales [Wommack et al., 1992; Weinbauer, 2004]. Большинство хвостатых фагов в морях и океанах принадлежали Siphoviridae (67–87 %), в меньшем количестве зарегистрированы Myoviridae (7–14 %) и Podoviridae (5–19 %), подтверждая, что 96 % всех фагов имеют хвостовой отросток [Ackermann, 2001]. Напротив, в пробах, отобранных как в пресной, так и соленой воде Куршского залива Балтийского моря, фаги семейства Myoviridae наиболее разнообразны и многочисленны [Sulcius et al., 2011].

Проведенные в 2008–2015 гг. исследования таксономического состава вирусов нейстона оз. Байкал, обитающих на границе фаз вода – воздух, а также входящих в микробиоценозы биопленок, сформированных на границе фаз вода – геологические породы в условиях литорали Байкала, дали иные результаты. Основным компонентом вирионейстона являлись бесхвостые бактериофаги (65 %), относящиеся к семействам Microviridae, Leviviridae и Tectiviridae. Доля хвостатых фагов в нейстоне оказалась ниже: вклад представителей семейства Podoviridae достигал 25 %, семейств Siphoviridae и Myoviridae – по 10 % каждый. В поверхностном микрослое в значительном количестве найдены нитчатые фаги семейства Inoviridae, отличающиеся длинными (до 2000 нм) гибкими и/или жесткими прямыми и тонкими изогнутыми нитями. Также наблюдали фаги, обладающие сходными ультраструктурными признаками с вирусами редких семейств Rudoviridae и Fuselloviridae, которые ранее в озере не регистрировали.

Морфологический анализ состава фагов биопленок, обрастающих пластины мрамора,

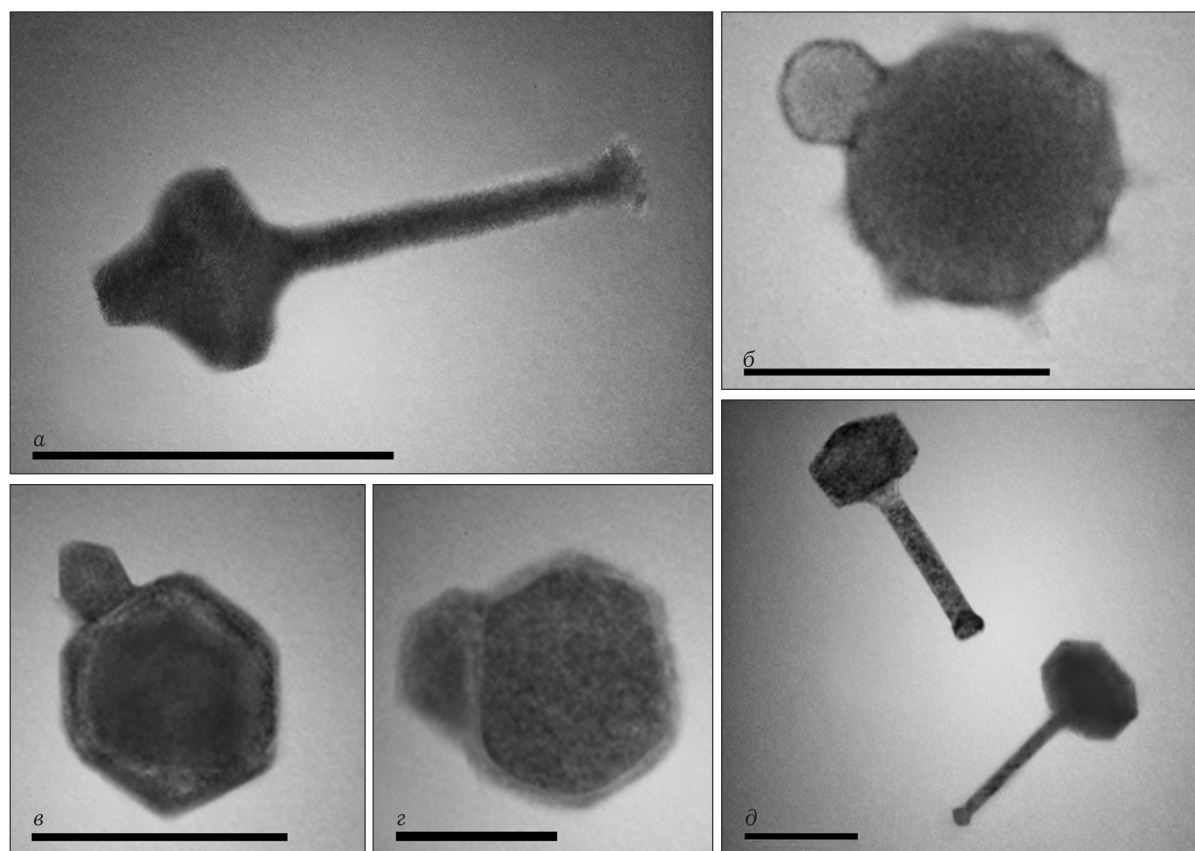


Рис. 5. Морфотипы эндемичных бактериофагов оз. Байкал: “юла” (а), головка с шипами (б), “оболочечный” с двумя оболочками и толстым хвостом (в, з), “молоток” (д). Трансмиссионная электронная микроскопия. Масштаб: а, в, з – 200 нм, б, д – 100 нм

гранита, слюды, кварца, амфиболита, габбро, уртита показал, что в них доминируют фаги семейства Podoviridae (40–50 %), за исключением биопленок, образованных на слюде, где они составляли около 23 %. Подовирусы, населяющие биопленки, характеризовались диаметром капсида 42–55 нм и длиной хвостового отростка 8–22 нм. На втором месте по встречаемости в биопленках (35–45 %) оказались мелкие фаговые частицы полигональной формы без отростков размером 30–52 нм, предположительно относящиеся к семейству Microviridae. В небольшом количестве обнаружены бактериофаги семейства Myoviridae и Siphoviridae. Единичными экземплярами представлены оболочечные фаги, а на пластинах мрамора и амфиболита отмечены нитчатые фаги семейства Inoviridae.

Анализ размерной структуры байкальских бактериофагов, обнаруженных в водной толще, установил, что планктонные фаги пред-

ставлены пятью классами величин: 1) ≤ 30 нм; 2) 30–60 нм; 3) ≥ 60 –80 нм; 4) ≥ 80 –100 нм; 5) ≥ 100 нм. Преобладали фаги размером 30–80 нм, частота встречаемости которых на разных глубинах варьировала от 20 до 95 % (55 ± 16 %, коэффициент вариации 30 %) с максимальными значениями в поверхностном слое воды. Субдоминантной группой являлись крупные фаги размером ≥ 100 нм со средней частотой встречаемости 24 ± 12 % (коэффициент вариации 53 %). Из общего числа изученных бактериофагов только 2–7 % представлены частицами с размерами ≤ 30 нм, которые являлись преимущественно фагами без хвостового отростка (рис. 6, а–в). Размеры бактериофагов в оз. Байкал и в других озерах мира приведены в таблице, которая демонстрирует, что особенностями байкальских фагов являются более значительные размеры их капсидов и хвостовых отростков. В морях и океанах доминировал относительно однородный по размеру вириопланктон с раз-

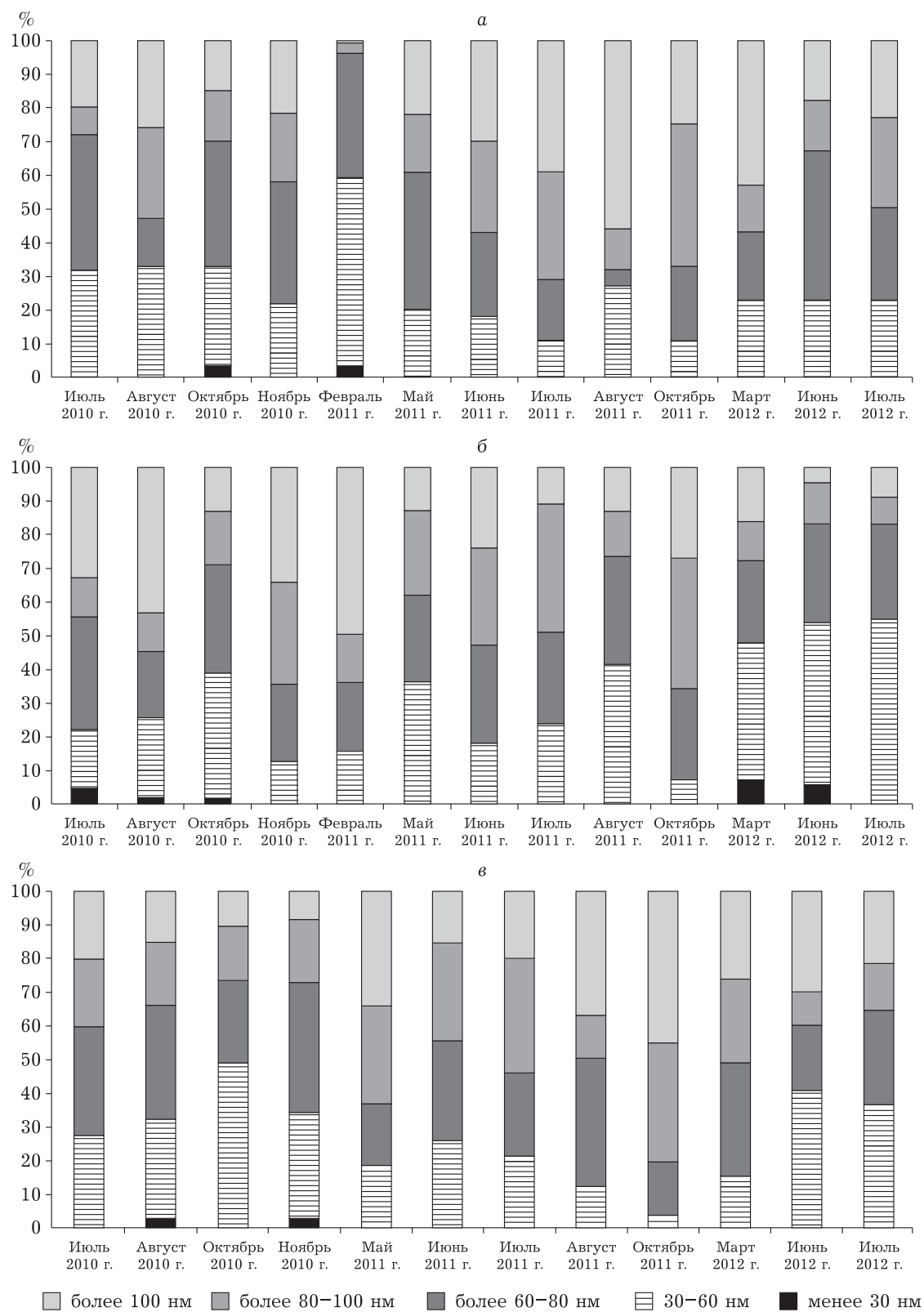


Рис. 6. Размерная структура капсида бактериофагов водной толщи на глубине 0 м (а), 25 м (б) и 250 м (в)

Размеры бактериофагов в различных озерах мира

Озеро Байкал [Дрюккер, Дутова, 2003]		Озеро Ладога [Сироткин и др., 2001]		Озеро Верхнее [Tapper, Hicks, 1998]	
диаметр головы, нм	длина хвостово- го отростка, нм	диаметр головы, нм	длина хвостово- го отростка, нм	диаметр головы, нм	длина хвостово- го отростка, нм
20–254	8–780	40–140	15–500	10–70	10–110

мером капсидов 30–60 нм [Wommack et al., 1992; Auguet et al., 2006].

В размерной структуре фагов нейстона преобладали (44 %) мелкие формы с диаметром капсида 30–60 нм. Фаги размером ≥ 60 –80 нм и более составляли 28 и 23 % соответственно. Частота встречаемости фагов размером ≤ 30 нм оказалась незначительной – 5 %. Численность бактериофагов в нейстоне варьировала от $0,05$ до $0,16 \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$.

Размерная структура бактериофагов биопленок, обрастающих горные породы в литорали оз. Байкал, представлена преимущественно (70–85 %) мелкими фаговыми частицами с диаметром капсида 30–60 нм. Размерный класс ≥ 60 –80 нм составил 10–25 %, а частота встречаемости частиц размером ≥ 80 нм оказалась незначительной. Общая численность бактериофагов на различных геологических породах изменялась в пределах – $0,03$ – $0,1 \cdot 10^6 \text{ см}^2$.

Численность свободных фаговых частиц в водной толще оз. Байкал в различные годы и сезоны изменялась от $0,01$ до $0,58 \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$, что сопоставимо с данными, полученными для других олиготрофных пресных водоемов мира [Tapper, Hicks, 1998; Hofer, Somma-

ruga, 2001]. Наибольшая численность фаговых частиц за время исследований отмечена в весенний и летне-осенний периоды в поверхностном слое воды, минимальная – в зимний период (рис. 7). Подобная сезонная динамика численности фагов согласуется с динамикой общей численности бактерий в воде озера. В вертикальном распределении бактериофагов в водной толще выявлена общая закономерность – снижение их количества с глубиной (рис. 8). Так, средняя численность свободных фаговых частиц за весь период исследований в поверхностном слое воды и на глубине 25 м составляла $(0,18 \pm 0,03) \cdot 10^6$ и $(0,16 \pm 0,04) \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$ соответственно. На глубине 250 м количество фагов значительно снижалось до $(0,09 \pm 0,01) \cdot 10^6$, на 500 м – $0,02 \cdot 10^6$, на 1000 м – $0,01 \cdot 10^6$, а у дна на глубине 1200 м происходило их увеличение до $0,03 \cdot 10^6 \text{ мл}^{-1}$ (рис. 9), что может быть связано с особенностью функционирования микробиоценоза глубоководной экосистемы в придонной зоне озера, где увеличивается содержание органического вещества. Полученные результаты позволили установить прямую связь численности фагов и бактерий на различных глубинах: коэффи-

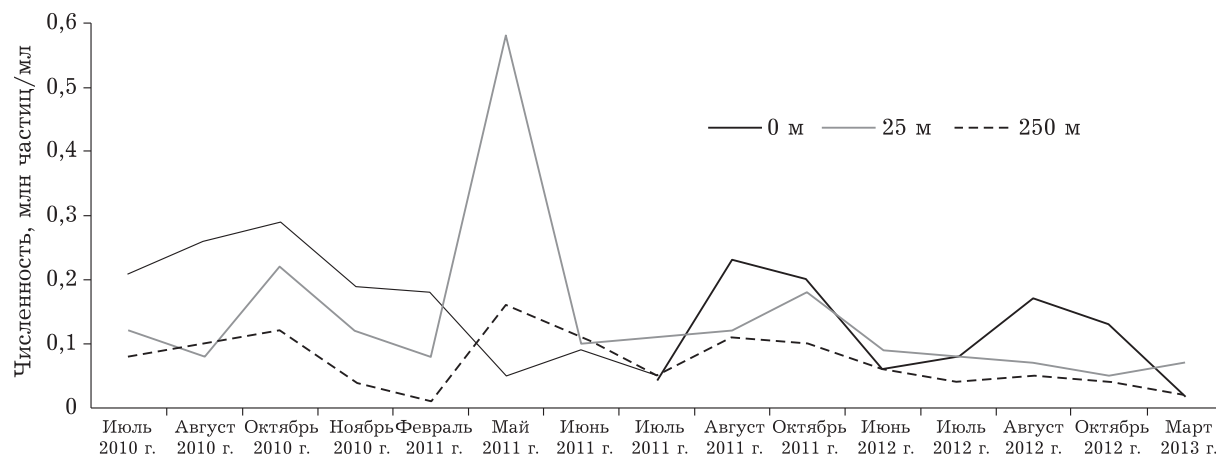


Рис. 7. Сезонная динамика численности бактериофагов на различных глубинах оз. Байкал

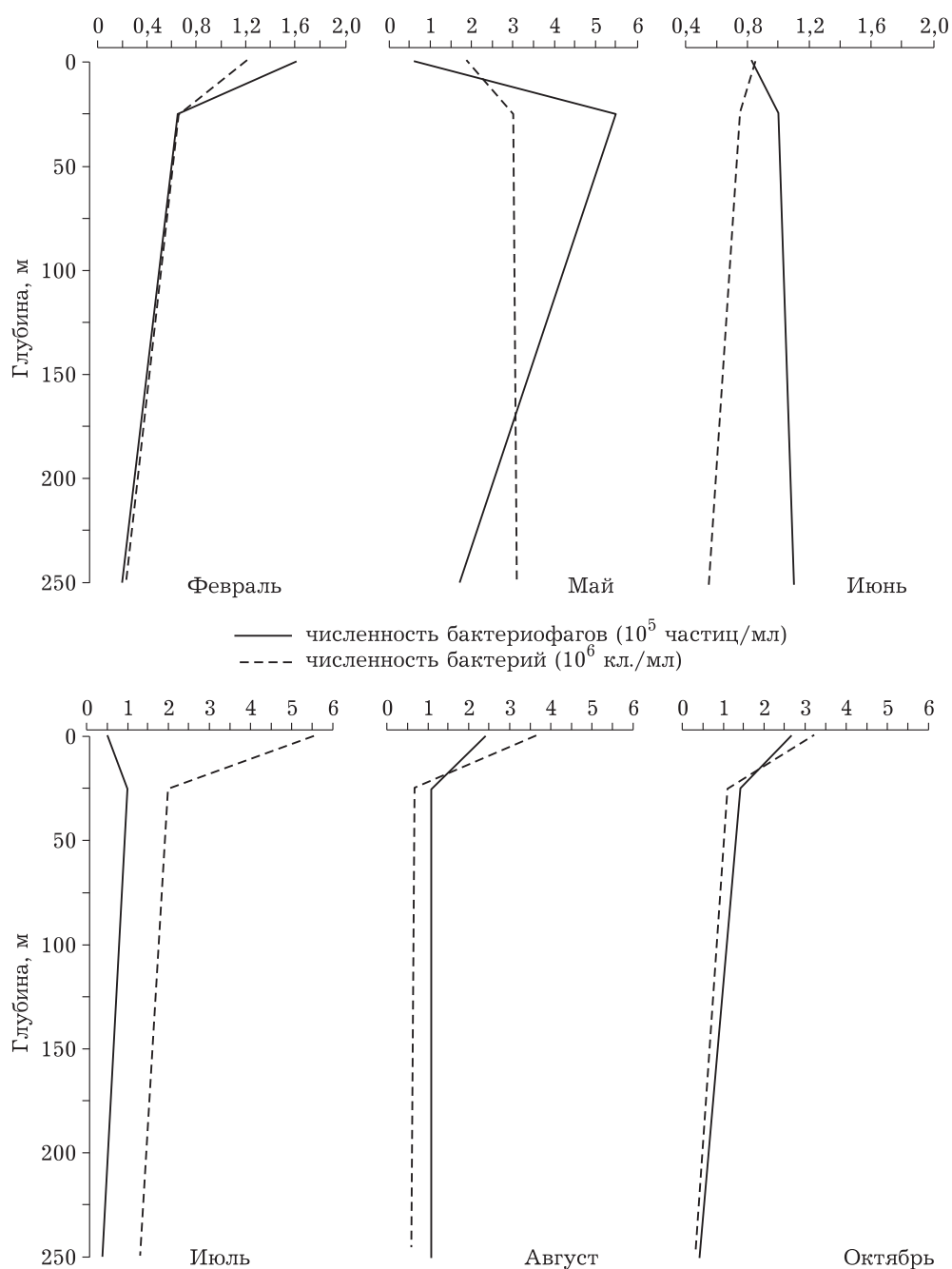


Рис. 8. Вертикальное распределение численности бактерий и бактериофагов в трофогенном слое воды оз. Байкал, 2011 г.

коэффициент корреляции этих показателей в поверхностном слое воды составил 0,42 ($p \leq 0,01$), на глубине 25 м – 0,74 ($p \leq 0,001$), на глубине 250 м – 0,62 ($p \leq 0,01$).

В 2005 г. начаты работы по выделению и изучению бактериофагов из оз. Байкал и его притоков, инфицирующих *P. aeruginosa*. Выбор объекта обусловлен повсеместной распространенностью бактерий рода *Pseudomonas*,

их экологической и медицинской значимостью. Основную часть изолированных псевдомонадных бактериофагов составили умеренные фаги семейства Siphoviridae. Такие фаги, образующие полупрозрачные бляшки с мутной серединой на “газоне” индикаторных бактерий, выделялись повсеместно на протяжении всего периода отбора проб воды. Несколько фагов этого семейства очищены в гради-

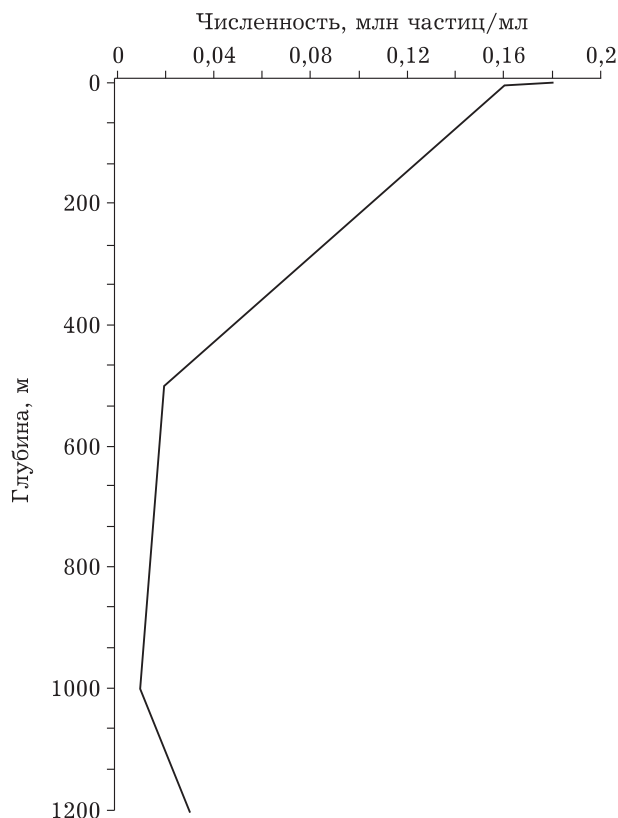


Рис. 9. Вертикальное распределение численности бактериофагов в водной толще оз. Байкал на глубинах 0–1200 м

енте хлористого цезия и изучены с применением молекулярно-генетических методов. Бактериофаги, изолированные из девяти районов оз. Байкал, оказались морфологически сходными и имели похожий набор структурных белков. Их таксономическую принадлежность с использованием набора праймеров к консервативным нуклеотидным последовательностям известных групп фагов, представленным в базе данных GenBank, не удалось идентифицировать. Методом секвенирования нового поколения (NGS) определен полный геном бактериофага семейства Siphoviridae – фага MD8, который имел 60 % гомологии с неклассифицированным бактериофагом F10 *P. aeruginosa* PAO1. Анализ генома фага MD8 выявил кластер генов, активность которых зависит от состояния биопленки, химических и физических факторов среды, что определяет его экологическую значимость.

Определен полный геном фага PaBG, инфицирующего штамм *P. aeruginosa* PAO1,

методом NGS. Бактериофаг PaBG, как показали данные электронной микроскопии, принадлежит семейству Myoviridae (морфотип A₁) и состоит из головки диаметром 136 нм и хвоста длиной 220 нм, что позволяет отнести его к гигантским фагам. Он имеет двухцепочечную ДНК длиной 258,139 п. н., количество открытых рамок считывания (ORF) составляет 308. Несколько предполагаемых ORF могут кодировать белки, участвующие в деградации клеточной стенки и лизисе бактерий. Гены PaBG кодируют собственные фаговые РНК- и ДНК-полимеразы. Гомология нуклеотидной последовательности фага PaBG с таковой других известных фагов невысокая. Ближайшим его родственником является фаг Lu11, выделенный из *Pseudomonas putida*, 125 ORF этих фагов сходны на уровне белков. Таким образом установлено, что байкальский фаг PaBG филогенетически отдален от других фагов псевдомонад [Sykilinda et al., 2014].

Выделено два суперинфекционных нитчатых фага семейства Inoviridae с набором структурных белков, различающиеся между собой размером репликативных форм ДНК. Результаты секвенирования 95 % генома одного из фагов показали его полную гомологию с геномом фага PF4 – профагом *P. aeruginosa* PAO1. Нитчатые фаги интересны своей жизненной стратегией, так как они способны разрушать природные биопленки микроорганизмов и участвовать в передаче информации между ними. Выделен фаг семейства Podoviridae, который является представителем известной консервативной группы КМV-подобных фагов.

Микроскопическими и молекулярно-генетическими методами охарактеризованы две группы фагов семейства Myoviridae, выделенные из разных районов оз. Байкал. Три литических бактериофага первой группы поражают большинство патогенных штаммов *P. aeruginosa*, вызывая отчетливые зоны лизиса. На основании проведенных исследований показано, что они являются представителями повсеместно распространенной консервативной группы PB1 фагов. Три других фага этого же семейства образуют едва заметные пятна лизиса на газоне клеток *P. aeruginosa* PAO1. Секвенирование отдельных фрагментов ДНК одного из этой группы фа-

гов и BLAST-анализ не выявили близкородственных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank.

Бактериофаги, найденные во все сезоны года в сообществах различных биотопов оз. Байкал: нейстоне, планктоне и бентосе можно считать автохтонными, т. е. постоянно обитающими в экосистеме озера. Они представляют ранее неизвестное звено в “микробной петле” водоема, которое существенно дополняет представления о структурно-функциональной организации экосистемы уникального глубоководного и древнейшего водоема. Очевидно, что бактериофаги занимают важное место в экосистеме оз. Байкал, взаимодействуя с другими звеньями трофической цепи. В современных моделях водных экосистем, включающих вириопланктон, показано, что вирусный лизис бактерий приводит к усиленному круговороту органического вещества, уменьшению его переноса на более высокие трофические уровни и увеличению валовой первичной продукции [Weitz, Wilhelm, 2012].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физико-химические условия глубоководной части оз. Байкал в последние десятилетия позволяют представителям биоты стабильно функционировать: термический режим воды глубже продуктивного слоя (150–250 м) постоянен (+3–4 °C), содержание суммы главных ионов по всей акватории остается неизменным – около 96 мг/дм³ (гидрокарбонатный класс, группа кальция), концентрация кислорода в воде на всех глубинах высокая – в среднем 9–14,5 мг/дм³, насыщение воды кислородом составляет 85–100 %, концентрации нитратов и фосфатов благодаря инерционности водной толщи озера не претерпели каких-либо существенных изменений с 1950-х гг. [Байкаловедение, 2012]. За чрезвычайно долгий период существования озера сформировалась уникальная биота для пресного водоема, 2/3 видов которой являются эндемичными. Не удивительно и то, что высокое таксономическое разнообразие установлено и при изучении автохтонных бактериофагов в различных биотопах оз. Байкал. Из 10 известных на момент исследования семейств фагов по данным международного

комитета по таксономии вирусов, методом трансмиссионной электронной микроскопии в экосистеме Байкала выявлено и изучено девять семейств из них: Siphoviridae, Myoviridae, Podoviridae, Microviridae, Leviviridae, Inoviridae, Tectiviridae, Fuselloviridae, Ruditoviridae. Кроме того, обнаружено четыре морфотипа фагов неизвестного систематического положения. Таким образом, большое биоразнообразие, характерное для флоры и фауны оз. Байкал, относится и к фагам.

С получением новых знаний об автохтонных водных бактериофагах становится понятным, что вирусы могут радикально изменять баланс жизненных процессов в водных экосистемах, прерывая многие звенья пищевых цепей, изменяя структуру сообществ, и как следствие этого – улучшать или ухудшать происходящие процессы самоочищения в них. В водных экосистемах в поверхностном микрослое на границе фаз вода – воздух формируются смешанные микробные сообщества – нейстон, включающие и бактериофагов (вирионейстон). Биопленка поверхностного микрослоя – это временное образование, существующее при благоприятных условиях окружающей среды, гибель бактерий в ней может происходить при воздействии физических факторов, таких как ветер, солнечная радиация, ледовой период. В микробентосных сообществах озера – в биопленках на границе фаз вода – геологические породы – условия существования организмов более стабильны, и потому структурно-функциональные показатели вириобентоса являются более постоянными в сравнении с вириопланктоном и вирионейстоном.

Для глубоководной олиготрофной экосистемы оз. Байкал установлена вполне определенная закономерность – фаги семейства Siphoviridae с длинным несократимым хвостовым отростком являются доминирующим семейством всей водной толщи, как и в большинстве других водных экосистем мира. В нейстоне преобладают бесхвостые фаги семейств Microviridae, Leviviridae, Tectiviridae, а в бентосных биопленках литорали озера – мелкие с укороченным отростком фаги семейства Podoviridae.

Изучение размерной структуры байкальских бактериофагов, обнаруженных в водной толще, показало, что их размерный спектр

представлен пятью классами величин: 1) ≤ 30 нм; 2) 30–60 нм; 3) ≥ 60 –80 нм; 4) ≥ 80 –100 нм; 5) ≥ 100 нм. Преобладающими являются фаги размером 30–80 нм, средняя частота встречаемости которых составила 55 ± 16 % с максимальным значением в поверхностном слое воды. Вторая группа в размерном спектре представлена крупными фагами размером ≥ 100 нм, доля которых достигала в среднем 24 ± 13 %. Только 2–7 % из общего числа бактериофагов составили частицы размером ≤ 30 нм, преимущественно это были фаги без хвостового отростка.

Численность свободных фаговых частиц в воде оз. Байкал в различные сезоны года изменялась от 0,01 до $0,58 \times 10^6$ мл⁻¹. Наибольшая численность фагов отмечается в весенний и летне-осенний периоды в поверхностном слое воды. Минимальное количество бактериофагов наблюдается в зимний период на глубине 1000 м. Подобная сезонная периодичность в развитии фагов согласуется с динамикой общей численности бактерий в воде озера. В вертикальном распределении бактериофагов в оз. Байкал отмечена общая закономерность – снижение их количества с глубиной. Однако на глубине 1200 м происходит увеличение численности фагов до $0,03 \times 10^6$ мл⁻¹, что, очевидно, сопряжено с особенностью функционирования микробиоценоза придонной зоны озера.

Впервые проведенные комплексные микробиологические, вирусологические и молекулярно-генетические исследования автохтонных бактериофагов в различных биотопах оз. Байкал позволили установить их высокое таксономическое разнообразие, особенности размерного спектра, численности, временного и пространственного распределения до максимальных глубин, что указывает на участие вириопланктона в функционировании самой древней глубоководной и пресноводной экосистемы мира. Автохтонные бактериофаги, входящие в состав вирионейстоны, вириопланктона и вириобентоса, являются многочисленными и важными компонентами водных микробных сообществ. Исследования в области экологии вирусов водных экосистем все еще находятся на начальной стадии, многие вопросы остаются до настоящего времени не выясненными и требуют дальнейших решений.

Выражаем благодарность ЦКП “Ультрамикрo-анализ” ЛИН СО РАН за предоставление трансмиссионного электронного микроскопа.

Работа выполнена по проекту АААА-А18-116122110061-6 “Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем: таксономическое разнообразие, особенности функционирования и биотехнологический потенциал”.

ЛИТЕРАТУРА

- Байкаловедение: в 2 кн. / гл. ред. Е. В. Скляр. Новосибирск: Наука, 2012. Кн. 1. 468 с.
- Бутина Т. В., Потапов С. А., Белых О. И., Беликов С. И. Генетическое разнообразие цианофагов семейства Myoviridae в составе сообщества байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* // Генетика. 2015. Т. 51, № 3. С. 384–388 [Butina T. V., Potapov S. A., Belykh O. I., Belikov S. I. Genetic diversity of cyanophages of the Myoviridae family as a constituent of the associated community of the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* // Rus. Journ. Genetics. 2015. Vol. 51, N 3. P. 313–317].
- Дрюккер В. В., Масленников А. А. Коли-фаги озера Байкал и его притоков // Современные проблемы экологии, природопользования и ресурсосбережения Прибайкалья: мат-лы Всесоюз. науч. конф. Иркутск: Изд-во Ин-та географии СО РАН, 1998. С. 279.
- Дрюккер В. В., Дутова Н. В. Фаги озера Байкал // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ: тез. Междунар. Байкальского микробиол. симп. Иркутск: Изд-во Ин-та географии СО РАН, 2003. С. 35.
- Дрюккер В. В., Дутова Н. В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал // ДАН. 2006. Т. 410, № 6. С. 847–849.
- Дрюккер В. В., Дутова Н. В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал // Там же. 2009. Т. 427, № 2. С. 277–281.
- Дутова Н. В., Дрюккер В. В. Вирусное сообщество биопленок, формирующихся на различных субстратах в природных условиях озера Байкал // Там же. 2013. Т. 450, № 4. С. 468–470.
- Копылов А. Л., Косолапов Д. В., Заботкина Е. А., Косолапова Н. Г. Трофические взаимосвязи между планктонными бактериями, гетеротрофными нанофлагеллятами и вирусами в мезоэвтрофном водохранилище // Сиб. экол. журн. 2016а. Т. 23, № 3. С. 352–363 [Kopylov A. I., Kosolapov D. V., Zabolotkina E. A., Kosolapova N. G. Trophic relationships between planktonic bacteria, heterotrophic nanoflagellates and viruses in a mesoeutrophic reservoir // Contemporary Problems of Ecology. 2016. Vol. 9, N 3. P. 297–305].
- Копылов А. И., Косолапов Д. Б., Заботкина Е. А., Румянцева Е. В. Вирусы в донных отложениях мезоэвтрофного водохранилища (Рыбинское водохранилище, Верхняя Волга) // Биол. внутр. вод. 2016б. № 3. С. 39–46 [Kopylov A. I., Kosolapov D. V., Zabolotkina E. A., Rumyantseva E. V. Viruses in bottom sediments of a mesotrophic reservoir (Rybinsk Reservoir, Upper Volga) // Inland Water Biol. 2016. Vol. 9, N 3. P. 251–257].

- Копылов А. И. Роль вирусов в структуре и функционировании микробных сообществ в пресноводных экосистемах // Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология. 2013. Т. 4. С. 354–367.
- Парфенова В. В., Гладких А. С., Белых О. И. Сравнительный анализ бактериальных сообществ планктона и биопленки в озере Байкал // Микробиология. 2013. Т. 82, № 1. С. 94–105 [Parfenova V. V., Gladkikh A. S., Belykh O. I. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal // Microbiology. 2013. Vol. 82, N 1. P. 91–101].
- Сироткин А. К., Гаврилова О. В., Волошко Л. Н. Вирусы в планктоне Ладожского озера // ДАН. 2001. Т. 378, № 3. С. 427–429 [Sirotkin A. K., Gavrilova O. V., Voloshko L. N. Viruses in Lake Ladoga plankton // Dokl. Biol. Sci. 2001. Vol. 378. P. 254–257].
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Ackermann H. W. Frequency of morphological phage description in the year 2000 // Arch. Virol. 2001. Vol. 146. P. 843–857.
- Auguet J. C., Montanie H., Lebaron P. Structure of viroplankton in the Charente estuary (France): Transmission electron microscopy versus pulsed field gel electrophoresis // Microbiol. Ecol. 2006. N 5. P. 197–208.
- Bergh O., Børsheim K. Y., Bratbak G., Haldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments // Nature. 1989. Vol. 340. P. 467–468.
- Børsheim K. Y., Bratbak G., Haldal M. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy // Appl. Environ. Microbiol. 1990. Vol. 56. P. 352–356.
- Børsheim K. Y. Native marine bacteriophages // FEMS Microbiol. Ecol. 1993. Vol. 102. P. 141–159.
- Bratbak G., Haldal M., Norland S., Thingstad T. F. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics // J. Appl. Environ. Microbiol. 1990. Vol. 56, N 5. P. 1400–1405.
- Brum J. R., Sullivan M. B. Rising to the challenge: Accelerated pace of discovery transforms marine virology // Nat. Rev. Microbiol. 2015. Vol. 13. P. 147–159.
- Brussaard C. P. D., Marie D., Bratbak G. Flow cytometric detection of viruses // J. Virol. Methods. 2000. Vol. 85, N 1–2. P. 175–182.
- Butina T. V., Belykh O. I., Maksimenko S. Y., Belikov S. I. Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia // FEMS Microbiol. Lett. 2010. Vol. 309, N 2. P. 122–129.
- Demuth J., Neve H., Witzel K. Direct electron microscopy study on the morphological diversity of bacteriophage populations in lake Plußsee // J. Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59, N 10. P. 3378–3384.
- Fuhrman J. A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects // Nature. 1999. Vol. 399. P. 541–548.
- Galachyants A. D., Belkova N. L., Sukhanova E. V., Blinov V. V., Parfenova V. V. Methods of neuston sampling for the quantitative characteristic of microbial communities of Lake Baikal // Inland Water Biol. 2016. Vol. 9, N 3. P. 329–336.
- Hendrix R. Bacteriophage genomics // Curr. Opin. Microbiol. 2003. Vol. 6, N 5. P. 506–511.
- Hofer J., Sommaruga R. Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: Importance of filamentous forms // Aquat. Microb. Ecol. 2001. Vol. 26. P. 1–11.
- Holmfeldt K., Middelboe M., Nybroe O., Riemann L. Large variability in host strain susceptibility and phage host-range govern interactions between lytic marine phages and their flavobacterium hosts // Appl. Environ. Microbiol. 2007. Vol. 73, N 21. P. 6730–6739.
- Mathias C. B., Kirscher A. K., Vilimirov B. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube river // J. Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61, N 10. P. 3734–3740.
- Noble R. T., Fuhrman J. A. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria // Aquat. Microbiol. Ecol. 1998. Vol. 14, N 2. P. 113–118.
- Noble R. T., Fuhrman J. A. Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products // Ibid. 1999. Vol. 20. P. 1–11.
- Porter K. G., Feig Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora // Limnol. Oceanogr. 1980. Vol. 25. P. 943–948.
- Potapov S., Belykh O., Krasnopeev A., Gladkikh A., Kabilov M., Tupikin A., Butina T. Assessing the diversity of the g23 gene of T4-like bacteriophages from Lake Baikal with high-throughput sequencing // FEMS Microbiol. Lett. 2017. Vol. 364. doi: 10.1093/femsle/fnx264.
- Proctor L. M., Fuhrman J. A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria // Nature. 1990. Vol. 343. P. 60–62.
- Sulcius S., Staniulis J., Paskauskas R. Morphology and distribution of phage-like particles in a eutrophic boreal lagoon // Oceanologia. 2011. Vol. 53, N 2. P. 587–603.
- Suttle C. A., Chan A. M., Cottrell M. T. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity // Nature. 1990. Vol. 347. P. 467–469.
- Suttle C. A. Viruses in the sea // Ibid. 2005. Vol. 437. P. 356–361.
- Sykilinda N. N., Bondar A. A., Gorshkova A. S., Kurochkina L. P., Kulikov E. E., Shneider M. M., Kadykov V. A., Solovjeva N. V., Kabilov M. R., Mesyanzhinov V. V., Vlassov V. V., Drukker V. V., Miroshnikov K. A. Complete Genome Sequence of the Novel Giant *Pseudomonas* Phage PaBG // Genome Announcements. 2014. Vol. 2, N 1. e00929–13.
- Tapper M. A., Hicks R. E. Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton // Limnol. Oceanogr. 1998. Vol. 43. P. 95–103.
- Weinbauer M. G. Ecology of prokaryotic viruses // FEMS Microbiol. Rev. 2004. N 28. P. 127–181.
- Weinbauer M. G., Peduzzi P. Frequency, size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes // Mar. Ecol.-Prog. Ser. 1994. Vol. 108. P. 11–20.
- Weitz J. S., Wilhelm S. W. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles // F1000 Biol. Reports. 2012. Vol. 4, N 17. P. 1–8.
- Wichels A., Biel S. S., Gelderblom H. R., Brinkhoff T., Muyzer G., Schutt C. Bacteriophage diversity in the North Sea // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64, N 11. P. 4128–4133.
- Wilhelm S. W., Suttle C. A. Viruses and nutrient cycles in the Sea // Bioscience. 1999. Vol. 49. P. 781–788.

Wommack K. E., Colwell R. R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. Molec. Biol. Rev. 2000. Vol. 64, N 1. P. 69–114.
Wommack K. E., Hill R. T., Kessel M., Russek-Cohen E., Colwell R. R. Distribution of viruses in the Chesapeake

Bay // Appl. Environ. Microbiol. 1992. Vol. 58, N 9. P. 2965–2970.
Zheng Y. Z., Webb R., Greenfield P., Reid S. Improved method for counting virus and virus like particles // J. Virological Methods. 1996. Vol. 62, N 2. P. 153–159.

Autochthonous Bacteriophages in the Structure of the “Microbial Loop” in Different Biotopes of Lake Baikal

V. V. DRUCKER¹, O. I. BELYKH¹, A. S. GORSHKOVA¹, A. A. BONDAR², N. N. SYKILINDA³

*Limnological Institute, SB RAS
Irkutsk, Ulan-Batorskaya str., 3
E-mail: drucker@lin.irk.ru*

*Genomic Core Facility, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS
Novosibirsk, Acedemican Lavrentyev ave., 8
E-mail: alex.bondar@mail.ru*

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS
Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10
E-mail: sykilinda@mail.ru*

The paper presents results of study of autochthonous bacteriophages – previously unknown element in the structure of the “microbial loop” in the ecosystem of deep oligotrophic Lake Baikal. Transmission electron microscopy method was applied to study morphological diversity of phages in the water column, surface microlayer and benthic biofilms at the water-rock (marble, granite, mica, quartz, amphibolite, gabbro, urtite) interface. Data on the size structure of the autochthonous bacteriophages, their quantity, seasonal dynamics and vertical distribution from the surface to the maximum depth of 1200 m in comparison with bacteria are given. A few morphotypes of Baikal autochthonous bacteriophages affecting *Pseudomonas aeruginosa* are isolated and characterized by means of molecular and genetic methods. Full genomes of a gigantic phage PaBG of the family Myoviridae and MD8 of the family Siphoviridae are determined.

Key words: bacteriophages, Lake Baikal, morphotypes, abundance, plankton, neuston, biofilms.