



УДК 578.81

Автохтонные бактериофаги в экосистеме озера Байкал – самого глубокого древнего озера мира: краткие итоги изучения

В. В. Дрюккер

Лимнологический институт СО РАН, Иркутск
E-mail: drucker@lin.irk.ru

Аннотация. Изложены краткие итоги исследований морфологического разнообразия, численности, размерного спектра автохтонных бактериофагов, выделенных из различных биотопов озера Байкал. Молекулярно-биологические исследования байкальских фагов выявили уникальность некоторых из них. Проведён биоинформационный анализ и расшифрован полный геном гигантского фага PaBG из семейства *Myoviridae*.

Ключевые слова: автохтонные бактериофаги, морфологическое разнообразие, численность, размерный спектр, геном, нейстон, биоплёнки, озеро Байкал.

Введение

В конце прошлого столетия внимание исследователей было обращено на высокую численность вирусов-бактериофагов, содержащихся в воде морей и океанов – до 10^{8-10} частиц в 1 мл воды [6; 7]. Было установлено, что автохтонные вирусы бактерий ввиду своей многочисленности в водных экосистемах оказывают крупномасштабное влияние на глобальные процессы в биосфере, в частности, участвуют в контроле численности, многообразия и эволюции микроорганизмов. Фаги – самые мелкие организмы водных экосистем, их величина измеряется в нанометрах. Они способны быстро размножаться, вызывая лизис бактерий, влиять на многие физиологические, биогеохимические и экологические процессы, осуществляют генетический перенос [8]. Обитание бактериофагов установлено и в пресноводных водоёмах, в том числе в одном из крупнейших древних озёр мира – Байкале.

Материалы и методы

Исследования коли-фагов в оз. Байкал и его притоках были начаты нами в 1997 г. [1]. В 2002–2007 гг. впервые с использованием метода трансмиссионной электронной микроскопии были проведены исследования морфологического разнообразия, размерной структуры, общей численности автохтонных бактериофагов во все сезоны года на различных (до 1 200 м) глубинах озера [2; 3]. Отбор проб воды проводился с помощью батометров преимущественно на центральной мониторинговой станции

разреза Листвянка – Танхой на Южном Байкале (51°42' N, 105° E) с поверхности и глубинных горизонтов 25, 250, 1 000 и 1 200 м в стерильные стеклянные флаконы. Бактериофаги осаждали с применением ультрацентрифуг Beckman-L8-55 (Beckman Instruments, США) и Sorvall Discovery-96 SE (Thermo Fisher Scientific, США), время центрифугирования 1,5–2 ч при скорости 100 000 об/мин. Изучение бактериофагов проводили на трансмиссионном электронном микроскопе LEO-906 E (Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении 40 000–70 000×. Общую численность бактерий во взятых пробах воды определяли на эпифлуоресцентном микроскопе Olympus BX51 (Olympus Corporation, Япония) с красителем ДАПИ (Biotium, США). Идентификация исследованных фагов проводилась согласно международной классификации [4].

Результаты и обсуждение

В водах Байкала установлено высокое таксономическое разнообразие автохтонных бактериофагов. Большинство впервые найденных и изученных автохтонных фагов (76 %) относится к отряду Caudovirales (хвостатые фаги), объединяющему в себе в зависимости от размеров и сократимости хвостовых отростков три семейства: Siphoviridae, Podoviridae, Myoviridae. Среди них преобладают (40–59 %) фаги сем. Siphoviridae (морфотипы В₁, В₂, В₃) с длинным несократимым хвостовым отростком. Это фаги с различной формой капсида, размер которого колеблется в пределах 20–254 нм, длина отростка составляет 45–780 нм. Следующим по встречаемости морфотипом были икосаэдрические бактериофаги сем. Podoviridae (морфотипы С₁, С₂) (11–32 %), которые имеют гексагональную форму на плоскости. Характерная особенность фагов этого семейства – наличие короткого конусовидного отростка без базальной пластинки, отходящего от одной из вершин многогранной головки. Размер головки 40–73 нм, длина отростка 8–29 нм. Доля бактериофагов сем. Myoviridae (морфотипы А₁, А₂) составляет 6–25 %. Его представители отличаются сложной структурной организацией сократимого хвостового отростка. Большинство фагов имеют базальную пластинку с разного рода структурами: зубцеобразными, войлочными придатками и шаровидными телами на конце отростка. Бактериофаги этого семейства имеют икосаэдрическую форму головки размером 69–143 нм, длина хвостовых отростков составляет 25–326 нм, длина чехлов – 15–121 нм.

В вириопланктоне оз. Байкал в небольшом количестве встречаются фаги семейств Microviridae, Leviviridae, Inoviridae, у которых отсутствует чётко дифференцированный отросток, характерный для большинства автохтонных вирусных частиц. Они имеют икосаэдрическую форму и малые размеры (36–42 нм) и отличаются от других форм своей однородностью как по размерам, так и по морфологии. Кроме них найдены крупные фаги без хвостового отростка размером 110–160 нм с наличием двух чётко выраженных оболочек.

Особый интерес представляют обнаруженные в Байкале формы бактериофагов, которые отсутствуют в современной международной классификации и не описаны для других водных экосистем. Так, в летний период был найден своеобразный морфотип, который имеет головку в форме юлы. Особенность других фагов заключается в том, что от капсида радиально отходят шиповидные выросты длиной 7 нм. Обнаружены фаги с двумя чётко дифференцированными оболочками и толстым хвостовым выростом, с вытянутой головкой поперёк хвостового отростка в форме молотка. Морфологические исследования вириопланктона поверхностных вод других водных экосистем также указывают на преимущественное распространение фагов отряда Caudovirales.

В 2008–2015 гг. нами проведены исследования таксономического состава и размерной структуры вирусного сообщества нейстона оз. Байкал, находящегося на границе раздела фаз *вода – воздух*, а также входящего в микробиоценозы биоплёнок, формирующихся на границе фаз *вода – геологические породы* в природных условиях литорали Байкала. В сообществе нейстона, в отличие от водной толщи, основную часть составляют бесхвостые бактериофаги (65 %), относящиеся к семействам Microviridae, Leviviridae, Tectiviridae. Фаги с укороченными конусовидными хвостовыми отростками сем. Podoviridae составляют около 25 %. Представители семейств Siphoviridae и Myoviridae, отличающиеся морфологией и наличием хвостового отростка и обладающие специализированными терминальными структурами, были немногочисленны – около 10 %. В вирионейстоне в значительном количестве были найдены нитчатые фаги семейства Inoviridae, представленные длинными (до 2 000 нм) гибкими и жёсткими прямыми и тонкими изогнутыми нитями. Найдены также бактериофаги, обладающие сходными структурными признаками с вирусами редких семейств Rudiviridae, Fuselloviridae, которые ранее в озере не регистрировались.

В размерной структуре фагов нейстонной плёнки на границе *вода – воздух* преобладали мелкие формы с диаметром капсида 30–60 нм (44 %). Фаги размером ≥ 60 –80 нм и более 80 нм 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 млн частиц/мл.

Изучение морфологического состава и размерной структуры фагов биоплёнок, формирующихся на границе: *вода – мрамор*, *вода – гранит*, *вода-слюда*, *вода – кварц*, *вода – габбро*, *вода – уртит* дало иные результаты. В составе микробного сообщества доминировали фаги сем. Podoviridae (40–50 %), за исключением биоплёнок на границе *вода – слюда*, где они составляли около 23 %. Это были фаги с диаметром капсида 42–55 нм и длиной хвостового отростка 8–22 нм. На втором месте по встречаемости в биоплёнках (35–45 %) были мелкие фаговые частицы гексагональной формы без отростков размером 30–52 нм, предположительно относящиеся к сем. Microviridae. В небольшом количестве обнаружены бактериофаги семейств Myoviridae и Siphoviridae. Единичными экземплярами представле-

ны оболочечные фаги, а на пластинах мрамора и амфиболита найдены нитчатые фаги сем. *Inoviridae*.

Размерная структура бактериофагов биоплёнок на горных породах преимущественно (70–85 %) представлена 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 средах изменялась в значительных пределах: 0,03–0,1 млн частиц/см².

В глубоководной олиготрофной экосистеме Байкала фаги семейства *Siphoviridae* доминируют по всей водной толще, как это наблюдается и в большинстве других водных экосистем. В нейстонной пленке на границе фаз *вода – воздух* преобладают бесхвостые бактериофаги семейств *Microviridae*, *Leviviridae*, *Tectiviridae*, а в биоплёнках, образованных на границе фаз *вода – геологические породы* в 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: ≤ 30 нм; 30–60 нм; ≥ 60 –80 нм; ≥ 80 –100 нм; ≥ 100 нм. Преобладают фаги с размерами 30–80 нм, частота встречаемости которых составляет 25–90 % на всех исследованных глубинах с максимальным значением в поверхностном слое воды. Субдоминантной группой в размерном спектре представлены крупные фаги с размерами ≥ 100 нм с частотой встречаемости до 56 %. Из общего числа изученных бактериофагов только 2–7 % – частицы с размерами ≤ 30 нм, которые преимущественно представлены фагами без хвостового отростка.

Численность свободных фаговых частиц в воде оз. Байкал в различные сезоны года изменялась от 0,01 до $0,58 \cdot 10^6$ частиц/мл. Наибольшая численность фагов отмечается в весенний и летне-осенний периоды в поверхностном слое воды, минимальное – в зимний период на глубине 1 000 м. Подобная сезонная периодичность в развитии фаговых частиц согласуется с динамикой общей численности бактерий в воде озера. В вертикальном распределении бактериофагов в Байкале отмечена общая закономерность – снижение их количества с глубиной. Однако на глубине 1 200 м наблюдается увеличение численности фагов до $0,03 \cdot 10^6$ частиц/мл, что может быть сопряжено с особенностями функционирования микробиоценоза придонной зоны озера. Полученные результаты позволили установить прямую связь численности фагов и бактерий на различных глубинах озера: 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 ($p \leq 0,01$).

Молекулярно-биологические исследования бактериофагов, выделенных из вод озера, позволили выявить уникальность некоторых из них. С использованием методов секвенирования проведён биоинформационный анализ и расшифрован полный геном гигантского фага PaBG из семейства *Myoviridae*, инфицирующего *Pseudomonas aeruginosa*. Не обнаружено су-

ственной гомологии его ДНК с ДНК других фагов, для которых известны последовательности геномов. Гигантский фаг PaBG имеет двухцепочечную ДНК длиной 258,139 п. н., с G-C-составом 55,82 %, в которых закодированы 308 открытых рамок считывания. Установлено, что 13 генов кодируют структурные компоненты вириона, идентифицированы пять генов, кодирующих белки транспорта РНК. Полученные результаты отражают разнообразие бактериофагов внутри семейства Myoviridae и приближают нас к пониманию роли вирусов в экологии и эволюционных процессах. Геномная последовательность гигантского байкальского фага PaBG зарегистрирована в GenBank (№ KF147891).

Заключение

Проведённые в 2002–2015 гг. в различных биотопах Байкала исследования позволили обнаружить и идентифицировать автохтонные бактериофаги, представляющие собой малоизвестное трофическое звено экосистемы Байкала. Были изучены их таксономическое разнообразие, размерный спектр, закономерности временного и пространственного распределения от поверхности до максимальных глубин. Повсеместное распространение вирусов указывает на активное участие вириопланктона в структуре и функционировании самой древней и глубоководной пресноводной экосистемы мира. На основе полученных результатов разработана схема «микробиальной петли», описывающая функционирование автохтонных организмов вириопланктона в экосистеме Байкала, взаимодействующих со всеми её составными частями. К сожалению, некоторые отечественные исследователи и в настоящее время не учитывают постоянное присутствие автохтонных водных вирусов и их важность для понимания биотических процессов, происходящих в различных водных экосистемах [5]. Результаты вышеописанных исследований ныне применяются для создания коллекции байкальских бактериофагов, некоторые из которых в дальнейшем могут стать объектами для практического использования в медицинских и биотехнологических целях.

Работа выполнена в рамках госзадания VI.55.1.3. № 0345-2014-0004.

Список литературы

1. Дрюккер В. В. Коли-фаги озера Байкал и его притоков / В. В. Дрюккер, А. А. Масленников // Современные проблемы экологии, природопользования и ресурсосбережения Прибайкалья : материалы Всесоюз. науч. конф. – Иркутск, 1998. – С. 279.
2. Дрюккер В. В. Фаги озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ : тез. Междунар. Байк. микробиол. симп. – Иркутск, 2003. – С. 35.
3. Дрюккер В. В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // Докл. РАН. – 2006. – Т. 410, № 6. – С. 847–849.
4. Ackermann H. W. Frequency of morphological phage descriptions in 1995 / H. W. Ackermann // J. Arch. Virol. – 1996. – N 141. – P. 209–218.

5. Boulion V. V. The biotic balance in Lake Baikal: Comparison of the results of modeling and observations / V. V. Boulion // Dokl. Biol. Sci. – 2016. – Vol. 468. – P. 142–145.

6. High abundance of viruses found in aquatic environments / O. Bergh [et al.] // Nature. – 1989. – N 340. – P. 467–468.

7. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics / G. Bratback [et al.] // J. Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – N 56. – P. 1400–1405.

8. Wommack K. E. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems / K. E. Wommack, R. R. Colwell // Microbiology and molecular Biology Reviews. – 2000. – Vol. 64, N 1. – P. 69–114.

Autochthonous Bacteriophages in the Ecosystem of Lake Baikal - the Deepest Ancient Lake in World

V. V. Drucker

Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

Abstract. We performed studies of morphological diversity, abundance, size spectrum of autochthonous bacteriophages using a modern method of transmission electronic microscopy isolated from different biotops of Lake Baikal. Molecular biological studies of Baikalian phages revealed a unique nature of some of them. We performed as well bioinformational analysis and deciphered the complete genome of a giant phage from the family Myoviridae, contaminating *Pseudomonas aeruginosa* – PaBG using modern new generation sequence methods (MiSeq, Illumina).

Keywords: autochthonous bacteriophages, morphological diversity, abundance, size range, genome, neuston, biofilms, Lake Baikal.

*Друккер Валентин Валерианович
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник
Лимнологический институт СО РАН
664033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. (3952) 42–54–15
e-mail: drucker@lin.irk.ru*

*Drucker Valentin Valerianovich
Doctor of Sciences (Biology), Professor,
Principal Research Scientist
Limnological Institute SB RAS
3, Ulan-Batorskaya st., Irkutsk, 664033
tel.: (3952) 42–54–15
e-mail: drucker@lin.irk.ru*