

**МОНИТОРИНГ АВТОХТОННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ – НОВОГО  
ТРОФИЧЕСКОГО ЗВЕНА РАЗЛИЧНЫХ БИОТОПОВ  
ГЛУБОКОВОДНОГО ОЗЕРА БАЙКАЛ**

**В.В. Дрюккер, Н.В. Дутова, А.С. Горшкова**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Лимнологический институт СО РАН, РФ, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
E-mail: drucker@lin.irk.ru

В статье представлены результаты поиска и исследований морфологического разнообразия, численности, размерного спектра автохтонных бактериофагов, выделенных из различных биотопов озера Байкал. Изучен морфологический состав, численность и размерный спектр фагов, входящих в микробиоценозы биопленок, формирующихся в Байкале на границе фаз вода – геологические породы: мрамор, гранит, слюда, кварц, габбро, уртит. В отличие от водной толщи в биопленках доминируют фаги семейства *Podoviridae* – 40–50%. Эти фаги с диаметром капсида 42–55 нм и длиной хвостового отростка 8–22 нм. На втором месте по встречаемости – 35–45%, это мелкие фаговые частицы без отростков, размером 30–52 нм гексагональной формы на плоскости, относящиеся к семейству *Microviridae*.

**Ключевые слова:** автохтонные бактериофаги, морфологическое разнообразие, численность, размерный спектр, биопленки, озеро Байкал.

**Введение.** В настоящее время одним из приоритетных направлений биологической науки является изучение вирус-бактериофагов, постоянно функционирующих в различных водных экосистемах. Автохтонные бактериофаги недавно обнаружены в морях и океанах и являются наиболее многочисленными биологическими объектами в водных экосистемах – до  $10^{8-9}$  частиц/мл [1]. Уже выяснено, что вирусы морских и пресноводных микроорганизмов, входящих в состав как планктона, так и бентоса, играют ключевую роль в контроле численности и видового многообразия своих хозяев, а также определяют формирование сложных микробиоценозов, Фаги так же переносят гены от одного хозяина к другому хозяину и между экосистемами. Таким образом, фаги во многом могут определять состав и качество вод. На пресноводных экосистемах подобные исследования начались позже и представляют несомненный приоритетный интерес, поскольку до сих пор не

ясен механизм формирования и поддержания качества их вод, не установлены особенности функционирования водоемов в различных климатических зонах, при различной морфометрии и глубинах, возрасте, а так же гидрологических и экологических условиях в бассейне. Впервые в воде олиготрофного, самого глубокого (1637 м) и древнего (25–30 млн лет) озера мира – Байкале методом трансмиссионной электронной микроскопии нами обнаружены и идентифицированы по международной классификации автохтонные бактериофаги [2, 3]. Полученные результаты на глубоководной станции в пелагиали Южного Байкала (до глубины 1200 м) в различные сезоны года показали высокое таксономическое разнообразие изученных фагов во всей водной толще, что позволило установить новое трофическое звено в экосистеме уникального пресного озера [4].

Цель настоящей работы заключалась в поиске и изучении особенностей ав-

тохтонных бактериофагов в различных биотопах озера Байкал: морфологического разнообразия, размерного спектра, численности в биопленках на границе фаз вода – различные геологические породы (гранит, мрамор, слюда, кварц, габбро, уртит), наиболее распространенные в береговой зоне оз. Байкал.

**Материалы и методы.** По современным представлениям до 99% микроорганизмов – хозяев бактериофагов в водных экосистемах, существуют в виде специфически организованных, прикрепленных к субстрату биопленок, формирующихся на поверхности раздела различных фаз. Это динамические структуры, в которых происходят разные метаболические процессы и взаимодействие между компонентами клеток. Межклеточный матрикс биопленок состоит из экзополисахаридов различной природы и зависит от состава микробного сообщества, участвующего в его создании. Развитие биопленочных сообществ – одна из основных стратегий выживания бактерий не только в окружающей природной среде, но и в инфицируемых микроорганизмах. Большой интерес вызывает поиск фагов, обладающих высокой активностью в разрушении биопленок патогенных микроорганизмов.

Забор биопленок, формирующихся на границе фаз вода – геологические породы (мрамор, гранит, слюда, кварц, габбро, уртит) проводился в прибрежной зоне Южного Байкала в условиях природного эксперимента (в течение пяти лет, полигон «Березовый») с пластин соответствующих геологических пород. Для поиска бактериофагов использовались образцы обрастаний с площади 12 см<sup>2</sup>, которые были суспендированы в 50 мл стерильной воды и интенсивно встряхивались в течение 5 мин. Затем 20 мл суспензии центрифугировали 20 мин при 50 g для удаления фито- и бактерио-

планктона. Супернатант отбирали для последующего электронно-микроскопического исследования. Вирусные частицы осаждали ультрацентрифугированием (бакет-ротор “Discovery-96 SE”, 100000g, время 2 ч). Осадок ресуспендировали в объеме 1,5 мл, суспензию в количестве 2 мкл наносили на медные сетки, покрытые формваруглеродной подложкой, высушивали на воздухе и контрастировали 1%-м раствором фосфовольфрамовой кислоты в течение трех минут. Из каждой пробы обрастаний было приготовлено по две сетки, на которых учитывались фаговые частицы на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) “LEO-906E” (Zeiss, Германия), ускоряющее напряжение 80 кВ и увеличение 40 000–70 000×. Таксономический состав бактериофагов определяли по международной классификации [5].

**Заключение.** Наши исследования бактериофагов в водной толще оз. Байкал до максимальных глубин позволили установить, что 76% их от общего количества относится к отряду *Caudovirales* (хвостовые фаги), объединяющему три семейства: *Siphoviridae* (морфотипы В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>) – 40–59% (рис. 1, а), *Podoviridae* (морфотипы С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>) – 11–32% (рис. 1, б), *Myoviridae* (морфотипы А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>) – 6–25% (рис. 1, в). В вириопланктоне Байкала в небольшом количестве также найдены представители семейств *Microviridae* – без хвостового отростка (рис. 1, г), *Leviviridae*, *Inoviridae*. Особый интерес представляют обнаруженные редкие формы фагов, которые не описаны авторами для других водных экосистем: имеющие капсид в форме «юлы» (рис. 1, д); с радиально отходящими от капсида шиповидными выростами (рис. 1, е); с двумя оболочками и толстым хвостовым отростком (рис. 1, ж); с вытянутым капсидом поперек хвостового отростка в форме «молотка» (рис. 1, з).

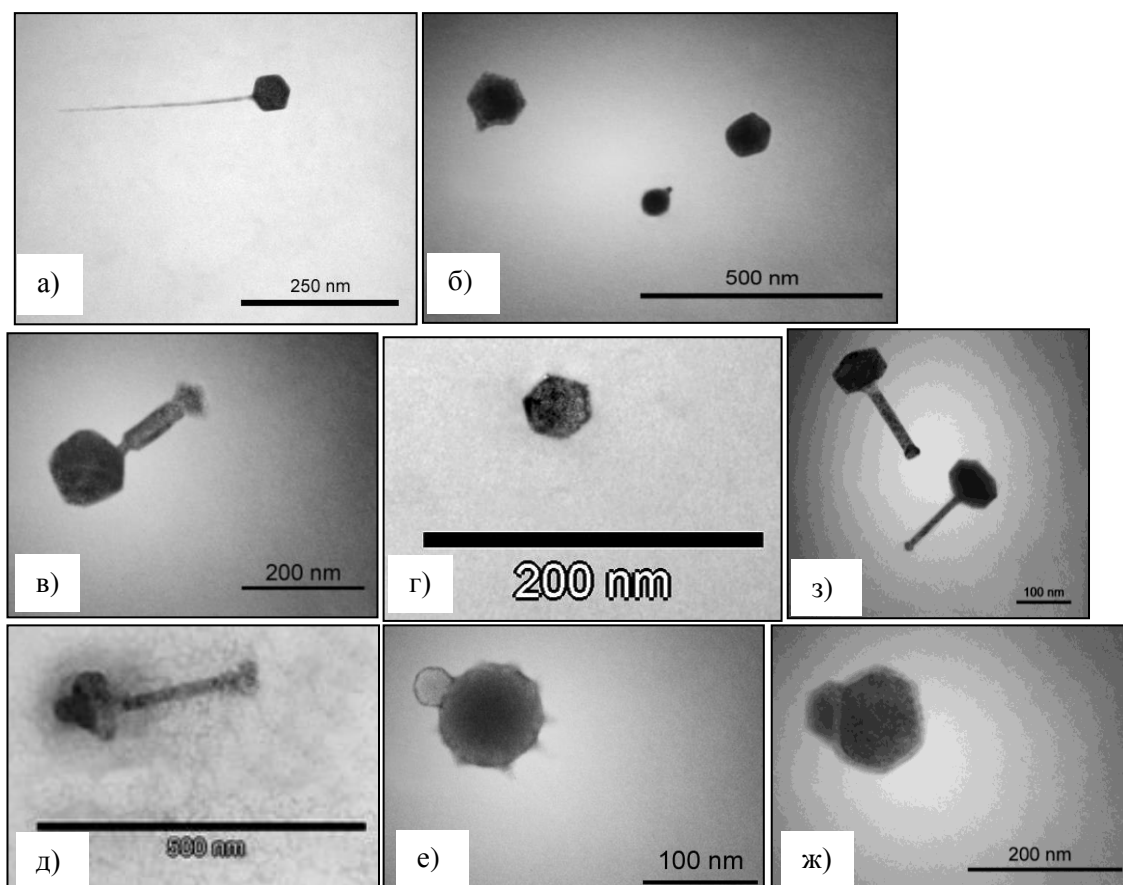


Рис. 1. Морфотипы бактериофагов водной толщи оз. Байкал (ТЭМ)

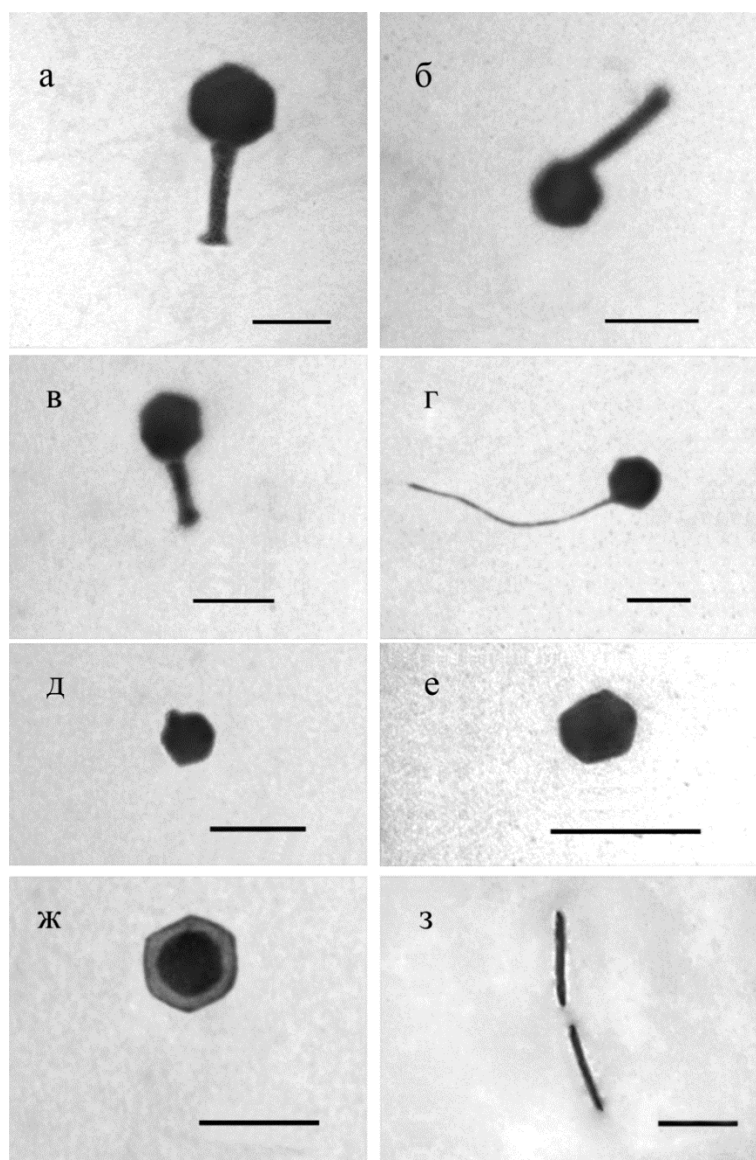
Изученный морфологический состав и размерная структура фагов, входящих в микробиоценозы биопленок, формирующихся в Байкале на границе фаз вода – геологические породы: мрамор, гранит, слюда, кварц, габбро, уртит показал, что в отличие от водной толщи в биопленках доминируют фаги семейства *Podoviridae* – 40–50% (рис. 2, д). Эти фаги имеют диаметр капсида 42–55 нм и длину хвостового отростка 8–22 нм. На втором месте по встречаемости – 35–45%, это мелкие фаговые частицы без отростков, размером 30–52 нм гексагональной формы на плоскости, предположительно относящиеся к семейству *Microviridae* (рис. 2, е). Так же в небольшом количестве на геологических породах обнаружены бактериофаги семейства *Myoviridae* (рис. 2, а, б, в), семейства *Siphoviridae* (рис. 2, г).

Единичные экземпляры оболочечных фагов (рис. 2, ж) найдены в биопленках на каменистых субстратах, только на пластинах мрамора и амфиболита найдены нитчатые фаги семейства *Inoviridae* (рис. 2, з). Известно, что нитча-

тые бактериофаги в основном являются лизогенными или умеренными фагами, инфекция которых широко распространена среди грамотрицательных бактерий [6].

Размерная структура бактериофагов обрастаний на горных породах оз. Байкал в большей степени (70–85%) представлена мелкими фаговыми частицами с диаметром капсида 30–60 нм. Размерный класс фагов  $\geq 60$ –80 составил 10–25%, а частота встречаемости частиц размером  $\geq 80$  нм оказалась незначительной. Общая численность бактериофагов на различных геологических средах изменялась в значительных пределах – 0,03–0,1 млн частиц/см<sup>2</sup>.

Следует отметить, что в изученных биопленках не обнаруживались те морфологические формы бактериофагов, которые присутствовали в придонной воде литоральной зоны оз. Байкал. В придонной воде присутствовал широкий спектр фагов с различной формой и размерами капсида, относящихся к отряду *Caudovirales* – 80%.



**Рис. 2.** Морфотипы бактериофагов биопленок на каменистых субстратах (ТЭМ, длина масштабной линейки 100 нм)

В него входили семейства *Siphoviridae* (морфотипы А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub>), *Podoviridae* (С<sub>1</sub>, С<sub>2</sub>), *Myoviridae* (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>). Бактериофаги представлены частицами икосаэдрической формы с диаметром головки 29–130 нм, длиной отростка 11–175 нм. Кроме доминантных форм, встречались фаговые частицы без хвостового отростка диаметром 29–120 нм, а также бесхвостые частицы с двумя четко выраженными оболочками. В составе вирусного сообщества одинаковую степень развития имели вирусы бактерий четырех размерных классов: 30–60, ≥60–80, ≥80–100, ≥100 нм с частотой встречаемости 20–28%. Для мелких фаговых частиц

(≤30 нм) частота встречаемости составляет всего 2%.

Процессы удаления вирусов из водных экосистем до сих пор не ясны, но могут включать следующие механизмы: 1. оседание крупных частиц различной природы с прикрепленными вирусами; 2. потребление свободных вирусов фаготрофными флагоеллятами; 3. разрушение вирусных частиц биоактивными молекулами (экзоэнзимы, протеазы, нуклеазы), которые изымают нуклеиновые кислоты из капсида вирусов; 4. гибель, вызванная вириофагами. Исследования в этой области водной вирусологии продолжаются.

Проведенный поиск, обнаружение и исследование вирусного сообщества биопленок, формирующихся на различных каменных субстратах: гранит, мрамор, кварц, слюда, габбро, уртит в природных условиях оз. Байкал, выявили отличия в морфологии, размерной структуре и численности бактериофагов. Следует отметить, что в изученных биопленках, формирующихся на природных каменных геологических породах в оз. Байкал, обнаруженные бактериофаги отличаются как по морфологическому составу и степени разнообразия, так и по численности и размерному спектру от их распределения в воде пелагиали и литоральной зоны озера. Бактериофаги, присутствующие в обрастаниях, морфологически и по размерному спектру менее разнообразны по сравнению с литоралью озера, где преобладают крупные хвостатые фаги отряда *Caudovirales*. Это указывает на наличие различных биологических систем «вирус – хозяин», а так же механизмов их взаимодействия в отличающихся экологических условиях функционирования биопленочных сообществ и вириопланктона оз. Байкал. Предварительные результаты, полученные по биоинформационному анализу и расшифровке полного генома гигантского байкальского фага (семейство *Myoviridae*), так же дополняют международную базу данных нуклеотидных последовательностей GenBank и окажутся полезными не только для расширения наших представлений о роли фагов в экологии и эволюционных процессах, но и могут

быть использованы на практике с целью получения новых рекомбинантных белков для молекулярной биологии и медицины.

*Работа выполнена по теме госзадания № 0345-2014-0004.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *High abundance of viruses found in aquatic environments* / O. Bergh, K. Vorseheim, G. Bratbak, M. Heldal // *Nature*. 1989. 340 (6233). P. 467–468.
2. Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Фаги озера Байкал // *Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ: Материалы науч. конф.* Иркутск, 8–13 сент. 2003. С. 35–36.
3. Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал // *Доклады академии наук*. 2006. № 410 (6). С. 847–849.
4. Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал // *Доклады академии наук*. 2009. 427 (2). С. 277–281.
5. Ackermann H.W. Frequency of morphological phage descriptions in 1995 // *J. Arch. Virol*. 1966. № 141. P. 209–218.
6. Брюсов Х., Каттер Э. Экология бактериофагов. Бактериофаги, биология и практическое применение / под ред. Э. Каттер, А.М. Сулаквелидзе. М.: Научный мир, 2012. № 6. С. 188–234.

## MONITORING OF AUTOCHTHONOUS BACTERIOPHAGES, A NEW TROPHIC CHAIN OF DIFFERENT BIOTOPES IN DEEP LAKE BAIKAL

V.V. Drucker, N.V. Dutova, A.S. Gorshkova

Limnological Institute SB RAS, Russian Federation, Irkutsk, Ulan-Batorskaya St., 3

The paper presents the results of search and studies of morphological diversity, abundance, size spectrum of autochthonous bacteriophages isolated from various isotopes of Lake Baikal. Morphological composition and size structure of phages were also studied in biofilm microcenoses at the water-geological rock interface: marble, granite, mica, quartz, gabbro, and urtite. Unlike water, biofilms were dominated by phages of the family *Podoviridae* (40–50%) with a capsid diameter of 42–55 nm and tail length of 8–22 nm. Phages without tails (30–52 nm) belonged presumably to the family *Microviridae* (35–45%).

**Keywords:** autochthonous bacteriophages, morphological abundance, size spectrum, biofilms, Lake Baikal.