

**ВИРУСНОЕ СООБЩЕСТВО БИОПЛЕНОК,
ФОРМИРУЮЩИХСЯ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ
В ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЯХ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

© 2013 г. Н. В. Дутова, В. В. Дрюккер

Представлено академиком М.А. Грачёвым 02.08.2012 г.

Поступило 09.01.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565213160275

По современным представлениям 95–99% микроорганизмов — хозяев фагов в водных экосистемах — существуют в виде специфически организованных, прикрепленных к субстрату биопленок, формирующихся на поверхности раздела 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 внешней среде, но и в инфицируемых микроорганизмах [1].

В природной среде биопленки представлены смешанными микробными популяциями, где с преобладанием прокариот наблюдается и развитие бактериофагов. Установлено, что при контакте фага с биопленками дальнейшие взаимодействия происходят в зависимости от восприимчивости бактерий к фагу и наличию рецепторных участков [2, 3].

Основную роль в лизисе биопленочных микроорганизмов выполняют фаги, обладающие ферментами разной специфичности, способные разрушать полисахаридную защиту (матрикс) и сами бактерии [4]. Отмечено, что геномы наиболее распространенного и изученного отряда бактериофагов *Caudovirales* (хвостатые фаги) кодируют как минимум один фермент, участвующий в процессе индуцирования бактерий и задействованный при выходе дочерних фагов из клетки в конце инфекционного цикла [5]. Активность бактериофагов обрастаний приводит к формированию структуры биопленки — появлению поло-

стей, каналов, пор и, как следствие этого, происходит нарушение ее целостности.

В настоящее время число исследований биопленочных сообществ обрастаний неуклонно растет, но немногие из них сосредоточены на изучении взаимодействия бактериофагов и бактериальных компонентов природных обрастаний в водных экосистемах. Кроме того, большой интерес вызывает поиск новых фагов, обладающих высокой ферментативной активностью в разрушении биопленок патогенных микроорганизмов.

В олиготрофном оз. Байкал нами впервые исследованы морфологическое разнообразие, размерный спектр и сезонная динамика численности бактериофагов на различных глубинах [6, 7].

Целью настоящих исследований является изучение морфологических особенностей и размерной структуры бактериофагов природных биопленок, образованных на естественных геологических породах и искусственном субстрате в пресноводном оз. Байкал.

Исследования вирусов биопленок были проведены совместно с комплексным изучением сообществ гидробионтов, заселяющих разного рода субстраты в условиях природного эксперимента. Материалом для работы послужили пластины, изготовленные из трех типов горных пород, наиболее распространенных в береговой зоне оз. Байкал: гранита, мрамора, амфиболита, а также были использованы стальные пластины. Пластины площадью 16–24 см² экспонировались на глубине 3 м в районе стандартной трансекты полигона “Березовый” (Южный Байкал) в течение пяти лет [8]. Для определения бактериофагов использованы образцы обрастаний с площади 12 см², которые были суспендированы в 50 мл стерильной воды и интенсивно встряхивались в течение 5 мин. Затем 20 мл суспензии центрифугировали 20 мин при 500g для удаления фито- и бактериопланктона. Супернатант отбирали для последующего электронно-микроскопического исследования. Вирус-

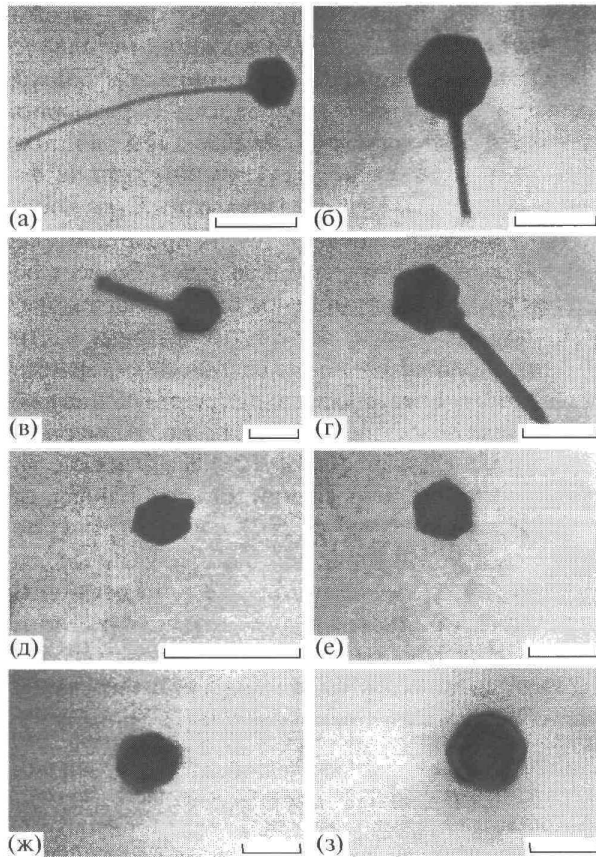


Рис. 1. Морфотипы бактериофагов в биопленках на металлической пластине (трансмиссионная электронная микроскопия). Длина масштабной линейки 100 нм. Объяснения в тексте.

ные частицы осаждали ультрацентрифугированием (бакет-ротатор “Discovery – 96 SE”, 100000g, время 2 ч). Осадок ресуспендировали в объеме 1.5 мл, 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 обрастаний было приготовлено по две сетки, на которых учитывались фаговые частицы. Препараты просматривали на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) “LEO-906E” (напряжение 80 кВ, увел. $35 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^5 \times$). Таксономический состав бактериофагов определяли по Аккерману [9].

В сообществе биопленок, сформировавшихся в природных условиях литорали оз. Байкал, были найдены вирусы различной морфологии и размерной структуры в зависимости от использованного субстрата. Так, основная часть бактериофагов биопленки, взятой с металлической пласти-

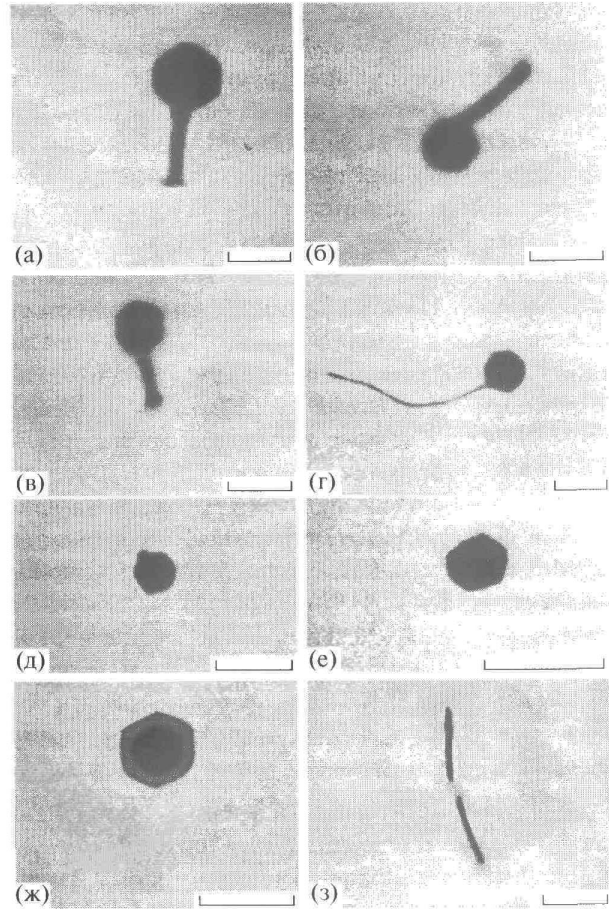


Рис. 2. Морфотипы бактериофагов в биопленках на каменных субстратах (трансмиссионная электронная микроскопия). Длина масштабной линейки 100 нм. Объяснения в тексте.

ны, представлена хвостатыми формами семейств: Siphoviridae (морфотипы A_1 , A_2) – 8% (рис. 1а, б), Myoviridae (B_2) – 14% (рис. 1в, г) с преобладанием Podoviridae (C_1) – 44% (рис. 1д). Фаги этого семейства имели короткий конусовидный отросток размером 11–38 нм, диаметр капсида 28–97 нм без выраженных структурных деталей. Значительную часть (30%) составляли морфологически однотипные частицы диаметром 28–100 нм без хвостового отростка, подобно морфотипу E_1 (рис. 1е, ж). Менее значимы в составе сообщества обрастаний металлической пластины – бесхвостые оболочечные вирусные частицы, составляющие до 4% (рис. 1з). В размерной структуре фагов в обрастаниях на стальной пластине наиболее часто встречались частицы размером 30–60 нм – 41% и ≥ 60 –80 нм – 39%. Крупные фаги, относящиеся к размерным классам ≥ 80 –100 и ≥ 100 нм, составляли 9 и 7% соответственно. Для частиц ≤ 30 нм зарегистрирован самый низкий уровень развития – 4%.

В биопленках, образованных на геологических породах трех типов – мраморе, граните и амфиболите, обнаружены разные группы бактериофагов: семейство *Myoviridae* (рис. 2а–в), семейство *Siphoviridae* (рис. 2г) и аналогично обрастаниям на металлической пластине доминируют представители семейства *Podoviridae* (C_1) – 45–50% (рис. 2д). Это фаги с диаметром капсида 42–55 нм и длиной хвостового отростка 8–22 нм. Второе место по значимости (35–45%) занимают мелкие бесхвостые фаговые частицы размером 30–52 нм гексагональной формы на плоскости, предположительно относящиеся к семейству *Microviridae* (рис. 2е). Оболочечные фаги в биопленках на каменных субстратах представлены единично (рис. 2ж). Только на пластинах из мрамора и амфиболита были найдены нитчатые фаги семейства *Inoviridae* (рис. 2з). 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 ≥ 60 –80 нм составил 10–25%, а частота встречаемости частиц размером ≥ 80 нм оказалась незначительной.

Следует отметить, что в изученных биопленках на природных и искусственных пластинах не обнаруживались те морфологические формы бактериофагов, которые присутствовали в придонной воде литоральной зоны оз. Байкал [6, 7]. Подобное различие наблюдалось и в таксономическом составе микроорганизмов [10]. В вириопланктоне придонной воды определен широкий спектр фагов с различной формой и размерами капсида, относящихся к отряду *Caudovirales* – 80%, включающий семейства *Siphoviridae* (морфотипы A_1 , A_2), *Podoviridae* (C_1 , C_2), *Myoviridae* (B_1 , B_2). 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 приобретают 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%.

Таким образом, впервые проведенные исследования вирусного сообщества биопленок, фор-

мирующихся на каменных субстратах – мраморе, граните, амфиболите, а также на металлической пластине в природных условиях оз. Байкал, выявили различия в морфологии и размерной структуре бактериофагов. Вместе с тем для них в равной степени характерно доминирование фагов семейства *Podoviridae* (морфотип C_1) и достаточно невысокий уровень других представителей хвостатых форм отряда *Caudovirales*. Во всех образцах изученных биопленок были обнаружены в меньшем количестве бесхвостые фаговые частицы, предположительно относящиеся к семейству *Microviridae*. Бактериофаги, присутствующие в обрастаниях, морфологически и по размерному спектру менее разнообразны по сравнению с вириопланктоном литоральной зоны оз. Байкал, где преобладают крупные хвостатые фаги отряда *Caudovirales*, которым присущи индивидуальные черты строения. Это указывает на наличие различных биологических систем вирус–хозяин и механизмов их взаимодействия в отличающихся экологических условиях функционирования биопленочных сообществ и вириопланктона оз. Байкал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гулицбург А.Л. // Генетика. 2004. Т. 40. № 11. С. 1445–1456.
2. Koval S.F., Bayer M.E. // Microbiology. 1997. № 143. P. 749–753.
3. Abedon S.T. In: Biofilms: Formation, Development and Properties. N.Y.: 2011. Ch. 1. P. 1–58.
4. Sutherland I.W., Hughes K.A., Skillman L.C., et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. № 232. P. 1–6.
5. Чертков О.В., Чупров-Неточин Р.Н., Легоцкий С.В. и др. // Биоорганическая химия. 2011. Т. 37. № 6. С. 807–814.
6. Дрюккер В.В., Дутова Н.В. // ДАН. 2006. Т. 410. № 6. С. 847–849.
7. Дрюккер В.В., Дутова Н.В. // ДАН. 2009. Т. 427. № 2. С. 277–281.
8. Timoshkin O.A., Sutorin A.N., Maximova N.V., et al. Berliner Palaeobiologische Abhandlungen. B., 2003. V. 4. P. 193–200.
9. Ackermann H.W. // Arch. Virol. 2007. V. 152. № 2. P. 227–243.
10. Белькова Н.Л., Долгих Н.В. В сб.: Тез. докл. V Верещагинской байкальской конференции. Иркутск: Иркут. обл. типография, 2010. С. 121–122.