

Национальный исследовательский
Томский государственный университет
Биологический институт
Кафедра физиологии растений и биотехнологии
МОО «Микробиологическое общество»
Общество физиологов растений России

**БИОТЕХНОЛОГИЯ, БИОИНФОРМАТИКА И ГЕНОМИКА
РАСТЕНИЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ**

**Материалы Всероссийской молодежной
научной конференции с международным участием
26–28 апреля 2016 года**

*Под редакцией
профессора О.В. Карначук*

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2016

метров микроклона по сравнению с действием синего света при равных концентрациях меди. Действие синего света способствовало снижению содержания фотосинтетических пигментов в растении. Это может найти своё практическое применение в дальнейшем при культивировании лишайника *in vitro* как лекарственного растения.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИОФАГА В КУЛЬТУРАХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ГЛУБИННОЙ ПОДЗЕМНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

**Ю.А. Франк, Е.А. Соломина, С.С. Суворина,
А.П. Лукина, О.В. Карначук**
Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

Изучение бактериофагов является важной составляющей исследований в области экологии микроорганизмов и молекулярной биологии. Уже в 1968 г. Вибе и Листон предположили, что фаги могут оказывать влияние на бактерии, контролируя их численность и изменяя возможности биохимических процессов (Wiebe, Liston, 1968). Из более поздних исследований известно, что вирусы оказывают большое влияние не только на круговорот органического вещества и энергии, они контролируют численность водных сообществ бактерий (Wilhelm, Suttle, 1999; Weinbauer, 2004; Eydal et al., 2009). В частности, они играют важную роль в горизонтальном переносе генов, в том числе в подземной биосфере (Labonté et al., 2015).

В 2013–2014 гг. были проведены совместные исследования ФИЦ «Фундаментальные основы современной биотехнологии» и кафедры физиологии растений и биотехнологии ТГУ по изучению глубинной биосферы в Томской области. С использованием пиросеквенирования были обнаружены последовательности ДНК, принадлежащие ранее не описанному бактериофагу семейства Podoviridae, в воде глубинного водоносного горизонта, вскрытого нефтепоисковой скважиной 1-Р в п. Белый Яр Верхнекетского района. Скважина изливает термальную подземную воду

(температура на устье около 45°C). Целью данной работы является поиск бактериофага в культурах микроорганизмов, полученных из этой глубинной (2,5 км) подземной экосистемы.

Объектами исследования являлись культуры сульфидогенных бактерий, полученные из воды глубинной скважины 1-Р. Выделение ДНК из культур выполняли с помощью набора PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Поиск бактериофага осуществлялся методом ПЦР с селективными праймерами BY_PhPr_A и BY_PhPr_B, разработанными в ФИЦ «Фундаментальные основы современной биотехнологии» (г. Москва) на основании известных последовательностей.

Анализировали присутствие фрагментов ДНК бактериофага в (1) накопительных культурах, выращенных при 50°C с добавлением в качестве источников углерода и электронов фруктозы, желатина и пептона, а также в (2) чистой культуре *Thermodesulfovibrio* sp.N1, выделенной из той же экосистемы и культивированной при 70°C. Первоначально использовалась пара праймеров BY_PhPr-A-BY_PhPr_B в концентрации 0,1 пмоль/мкл (как рекомендовано разработчиками), однако фрагмент ДНК бактериофага не был амплифицирован ни в одной из культур.

В ходе исследования подбирали оптимальные условия для амплификации фрагментов ДНК бактериофага путем подбора концентрации праймеров и изменения температуры отжига праймеров. При увеличении концентрации праймеров до 0,2 мкмоль/мкл был амплифицирован участок ДНК бактериофага из накопительной культуры, выращенной на желатине. Далее концентрацию праймеров подняли до 1 мкмоль/мкл, а время отжига увеличили с 30 с до 1 мин, что позволило успешно амплифицировать участок ДНК бактериофага в накопительных культурах, выращенных на желатине и фруктозе.

Ранее проведенный ПЦР-ДГГЭ анализ доминирующих бактерий в накопительной культуре, выращенной на желатине при 50°C и содержащей бактериофаг, показал присутствие фило типов, близкородственных *Thermodesulfovibrio* (Nitrospirae). Из накопительной культуры был выделен штамм *Thermodesulfovibrio* sp.N1, оптимально растущий при более высоких температурах. Однако в тотальной ДНК, выращенной на среде Видделя при 70°C, ДНК бактериофага методом ПЦР не обнаружено.

Возможно, температура 70°C, при которой культивировали штамм N1, слишком высока для развития бактериофага.

Один из экспериментальных подходов для выяснения возможного хозяина бактериофагов состоит в заражении чистых культур вирусными частицами (см. напр., Eydal et al., 2009). Мы планируем провести эксперимент по заражению чистой культуры *Thermodesulfovibrio* sp.N1 культуральной жидкостью с подтвержденным содержанием бактериофага, очищенной от клеток бактерий и содержащей лишь частицы вируса. Дальнейшее выращивание зараженной культуры планируется при температуре 50°C, близкой к температуре подземной воды.

Таким образом, в результате подбора оптимальных условий методом ПЦР с селективными праймерами в культурах из глубинной воды скв. 1-Р обнаружены фрагменты ДНК ранее неопisanного бактериофага, детектированного в метагеноме. Для определения возможного хозяина бактериофага требуются дополнительные исследования, хотя его поливалентность также не исключена.

Авторы благодарят д.б.н., профессора Н.В. Равина и к.б.н. В.В. Кадникова за предоставленные последовательности праймеров для амплификации фрагмента ДНК бактериофага.

Литература

1. Wiebe W., Liston J. Isolation and characterization of a marine bacteriophage // *Mar. Biol.* 1968. Vol. 1. – P. 244–249.
2. Wilhelm S.A., Suttle W.C. Viruses and nutrient cycles in the sea // *Bio-science.* 1999. Vol. 49. P. 781–788.
3. Weinbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses // *FEMS Microbiol Rev.* 2004. Vol. 28. P. 127–181.
4. Eydal S.C.H. [et al.]. Bacteriophage lytic to *Desulfovibrio aespoeensis* isolated from deep groundwater // *The ISME Journal.* 2009. Vol. 3. P. 1139–1147.
5. Labonté J.M., Field E.K., Lau M., Chivian D., Van Heerden E., Wommack K.E., Kieft T.L., Onstott T.C., Stepanauskas R. Single cell genomics indicates horizontal gene transfer and viral infections in a deep subsurface Firmicutes population // *Front Microbiol.* 2015. Vol. 6. P. 349.