

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

3. McMahon S., Parnell J. Weighing the deep continental biosphere // FEMS Microbiol Ecol. 2014. Vol. 87. P. 113–120.

4. Orcutt B.N. [et al.]. Microbial activity in the marine deep biosphere: progress and prospects // Frontiers in microbiology. 2013. Vol. 4.

5. Enning D. [et al.]. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust // Environmental Microbiology. 2012. Vol. 14 (7). P. 1772–1787.

6. Haouari O. [et al.]. *Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus* sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring // System. Appl. Microbiol. 2008. Vol. 31. P. 38–42.

ДОМИНИРУЮЩИЕ ФИЛОТИПЫ EUKARYOTA В ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЭКОСИСТЕМАХ АЛТАЯ И КУЗБАССА *

А.С. Сопыряева, Ю.А. Франк, А.Л. Герасимчук, О.В. Карначук

Национальный исследовательский Томский
государственный университет, Томск, Россия

Разнообразие представителей Bacteria и Archaea в экстремальных экосистемах хорошо изучено путем амплификации и разделения фрагментов гена 16S рРНК, пиросеквенирования и протеомики. Гораздо меньше данных об эукариотической составляющей экосистем, связанных с экстремальными факторами, такими как кислые шахтные дренажные воды или высокотемпературная глубинная биосфера. Однако результаты отдельных исследований, проведенных с помощью молекулярных методов, подтверждают присутствие разнообразных видов и метаболическую активность Eukaryota в кислых ($\text{pH} \leq 2$) экосистемах, связанных с высокими концентрациями металлов (Amaral Zettler et al., 2002; Baker et al., 2004; Baker et al., 2009; Dasgupta et al., 2012). Представители Nematoda и микроскопические грибы не так давно обнаружены в глубинных подземных водах (Borgonie et al., 2011; Sohlberg et al., 2015).

* Исследование поддержано грантом РФФИ № 16-04-01619 А (соглашение № 16-04-01619/16 от 19.02.2016 г.).

Целью работы было изучение доминирующих филоотипов Eukaryota в образцах воды, осадков и микробных обрастаний с использованием разделения амплифицированных фрагментов гена 18S рРНК в денатурирующем градиенте (ПЦР-ДГГЭ). Объектами настоящего исследования стали образцы из экстремальных экосистем: (1) микробные обрастания (маты) из ручья, ассоциированного с затопленной шахтой Северная в Кузбассе; (2) осадки хвостохранилищ добычи и обогащения металлических руд в Республике Алтай; (3) донные осадки озера Гейзерного в Республике Алтай. Для оценки филогенетического разнообразия Eukaryota из каждого образца была выделена тотальная ДНК. Выделенную ДНК использовали в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции. ПЦР проводили последовательно с двумя парами праймеров на фрагмент гена 18S рРНК: (1) EukA и EukB; (2) Euk20F и Euk516R-GC. Для идентификации доминирующих филоотипов эукариот полученные фрагменты гена 18S рРНК разделены в денатурирующем градиентном геле-электрофорезе (ДГГЭ) с последующим секвенированием и анализом последовательностей.

Подавляющее большинство эукариотических филоотипов из микробных обрастаний Кузбасса принадлежали олигохетам *Limnodrilus udekemianus* со 100% гомологией последовательности фрагмента гена 18S рРНК. Помимо последовательностей, гомологичных *L. udekemianus*, в образцах были обнаружены филоотипы, родственные некультивируемым эукариотическим клонам из арктических морских осадков (Stoeck et al., unpublished) и активного ила сточных вод в Японии (Matsunaga et al., 2014). Ближайшие валидно описанные представители динофитовых водорослей демонстрировали сходство последовательностей от 83% (*Amphidoma languida*) до 96% (*Opisthonecta minima*).

Два эукариотических филоотипа успешно секвенированы из тотальной ДНК осадков с частицами пирита, собранных вблизи Калгутинской фабрики по обогащению вольфрамово-молибденовой руды. Оба филоотипа были близкородственны (100% гомология частичной последовательности гена 18S рРНК) базидиомицету *Cryptococcus keelungensis*. Тогда как доминирующие Eukaryota из объединенной пробы осадков хвостохранилища той же фабрики принадлежали разнообразным представителям Ascomycota с 99–100% гомологией последовательности.

В донных осадках центральной части озера Гейзерное найдено несколько филотипов нематод *Tobrilus cf. zakopanensis* (100% гомологии последовательности фрагмента гена 18S рРНК). Нематоды *Tobrilus zakopanensis* ранее обнаруживали в высокогорных подземных источниках в Альпах (Zullini et al., 2011). Среди филотипов, полученных из восстановленных (–272 мВ) донных осадков мелководной части озера успешно секвенированы фрагменты гена 18S рРНК, принадлежащие членистоногим *Ameletus* sp.Eph23 (100% гомологии последовательности) и *Candona fabaeformis* (99–100%).

Таким образом, в исследованных экстремальных экосистемах Кузбасса и Алтая методом ПЦР-ДГГЭ найдены филотипы, принадлежащие червям, членистоногим, динофитовым водорослям и грибам. Особый интерес представляет обнаружение филотипов, удаленных от ближайших валидно описанных представителей эукариот. Наиболее вероятно, экстремальные экосистемы располагают не только развитыми прокариотическими сообществами, но и являются местообитаниями для новых, не описанных до сих пор представителей домена Eukaryota.

Литература

1. Baker B. [et al.]. Insights into the Diversity of Eukaryotes in Acid Mine Drainage Biofilm Communities // Applied and Environmental Microbiology. 2009. Vol. 75. P. 2192–2199.
2. Baker B. [et al.]. Metabolically active eukaryotes in extremely acidic mine drainage // Applied and Environmental Microbiology. 2004. Vol. 70. P. 6264–6271.
3. Borgonie G. [et al.]. Nematoda from the terrestrial deep subsurface of South Africa // Journal Nature. 2011. Vol. 474. P. 79–82.
4. Dasgupta S. [et al.]. Biosynthesis of sterols and wax esters by Euglena of acid mine drainage biofilms: Implications for eukaryotic evolution and the early Earth // Chemical Geology. 2012. Vol. 306–307. P. 139–145.
5. Matsunaga K. [et al.]. Molecular Diversity of Eukaryotes in Municipal Wastewater Treatment Processes as Revealed by 18S rRNA Gene Analysis // Microbes and Environments. 2014. Vol. 29. P. 401–407.

6. *Sohlberg E. [et al.]*. Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland // *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. P. 1–11.

7. *Zettler A. [et al.]*. Eukaryotic diversity in Spain's river of fire // *Nature*. 2002. Vol. 417. P. 137.

8. *Zullini A. [et al.]*. Microhabitat preferences in springs, as shown by a survey of nematode communities of Trentino (south-eastern Alps, Italy) // *J. Limnol.* 2011. Vol. 70. P. 93–105.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПОВ РОСТА ГУСЕНИЦ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ВИРУСУ ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО СОСТАВА

О.В. Охлопкова, А.А. Моисеева

Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Россия

Загрязнение окружающей среды является одной из наиболее актуальных проблем современности. В результате промышленной деятельности человека в экосистемы попадает большое количество вредных соединений, представляющих угрозу для здоровья самого человека и биосферы в целом. Для того чтобы оценить степень опасности распространения какого-либо поллютанта в среде, используют систему стресс-индексов, согласно которой химические пестициды являются наиболее неблагоприятными загрязнителями. Не только узкому кругу специалистов, но и широкой общественности становится понятно, насколько важно ограничить применение химических пестицидов и увеличить использование экологически безопасных, биологических способов защиты растений от насекомых-вредителей.

В обширном комплексе энтомопатогенных микроорганизмов одно из важных мест занимают бакуловирусы. Биологические особенности бакуловирусов, связанные с их высокой биологической эффективностью и

экологической безопасностью, соответствуют требованиям защиты растений. Вирусы способны размножаться исключительно в живых клетках хозяина, что обуславливает специфику их наработки. Производство биопрепаратов на основе бакуловирусов возможно при использовании культур клеток либо на лабораторных популяциях насекомых. На данный момент второй способ является наиболее оптимальным. Следовательно, важным звеном в наработке данных биопрепаратов является культивирование насекомых в лаборатории.

Одним из главных условий успешного выращивания насекомых является правильный подбор искусственной питательной среды (ИПС), которая сможет удовлетворять всем особенностям конкретного насекомого. Если ИПС подобрана корректно, насекомые будут быстрее достигать целевого возраста, что снизит объем трудозатрат, также будут правильно формироваться клетки жирового тела, что позволит получить большую вирусную массу.

Целью нашего исследования является изучение темпов роста гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.) при культивировании на ИПС с различным составом и степени чувствительности насекомых к вирусу ядерного полиэдроза (ВЯП).

Для проведения исследования грену непарного шелкопряда (НШ) собирали во II декаде октября 2015 г. в Ордынском районе Новосибирской области в очаге массового размножения насекомых в лесозащитных полосах. Яйца подвергали поверхностной стерилизации 0,6%-ным раствором перекиси водорода в течение 20 мин. Промывали дистиллированной водой. Ставили на активацию в термостат при температуре 24°C и влажности 70%. Отродившихся гусениц рассаживали группами в чашки Петри с ИПС трех видов, которые различались по ключевым компонентам: 1) кукурузная мука, 2) фасоль, 3) дрожжевой экстракт. При культивировании НШ фиксировали личиночные стадии. Результаты этого исследования представлены в табл. 1.

Скорость достижения целевого возраста у гусениц, культивируемых на ИПС с фасолью, составила 12 суток, что на 2 суток быстрее, чем у гусениц, культивируемых на ИПС с кукурузной мукой. Наиболее низкую скорость достижения III возраста имели гусеницы, выращенные на ИПС с дрожжевым экстрактом – 16 суток.