

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ  
Сибирского отделения Российской академии наук**

*На правах рукописи*



**ПОТАПОВ**  
Сергей Анатольевич

**ВИРУСНЫЕ СООБЩЕСТВА В ОЗ. БАЙКАЛ**

03.02.08 – экология

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук,  
доцент Белых О. И.

Иркутск, 2021

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1 Общая характеристика вирусов.....	12
1.2 Вирусы в водоёмах.....	24
1.2.1 Вирусы в морских экосистемах.....	24
1.2.2 Вирусы в пресноводных экосистемах.....	25
1.2.3 Вирусы – активные компоненты трофических цепей водных экосистем.....	29
1.3 История изучения вирусов на Байкале.....	31
1.4 Молекулярно-генетические исследования водных бактериофагов.....	32
1.5 Исследование гена <i>g23</i> с использованием высокопроизводительного секвенирования.....	35
1.6 Метагеномные исследования вирусных сообществ.....	36
1.7 Анализ $\beta$ -разнообразия сообществ.....	38
1.8 Проточная цитометрия.....	39
<b>ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	41
2.1 Объекты исследования.....	41
2.2 Методы исследования.....	44
2.2.1 Химический анализ воды.....	44
2.2.2 Определение концентрации хлорофилла.....	44
2.2.3 Эпифлуоресцентная микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, проточная цитометрия.....	45
2.2.4 Секвенирование гена <i>g23</i> T4-подобных бактериофагов в биоплёнках методом Сенгера.....	47
2.2.5 Таргетное секвенирование фрагмента гена <i>g23</i> с использованием высокопроизводительного секвенирования.....	48
2.2.6 Метагеномное секвенирование вирусного сообщества в оз. Байкал (виром).....	51
<b>ГЛАВА 3. ЧИСЛЕННОСТЬ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ И БАКТЕРИЙ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ</b> .....	54

3.1 Оценка численности бактерий и вирусных частиц методами проточной цитометрии и эпифлуоресцентной микроскопии .....	54
3.2 Оценка вертикального распределения вирусных частиц, бактерий, пикоцианобактерий в разные периоды термальной стратификации .....	61
3.3 Сезонная динамика численности вирусных частиц и бактерий, метод ЭФМ.....	65
3.4 Межгодовая динамика численности вирусных частиц и бактерий, метод ЭФМ.....	66
<b>ГЛАВА 4. АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ G23-СООБЩЕСТВ БАКТЕРИОФАГОВ В БИОПЛЁНКАХ ОЗ. БАЙКАЛ.....</b>	<b>69</b>
<b>ГЛАВА 5. АНАЛИЗ G23 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БАКТЕРИОФАГОВ ОЗ. БАЙКАЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ .....</b>	<b>80</b>
<b>ГЛАВА 6. МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРИОПЛАНКТОНА ПЕЛАГИАЛИ ОЗ. БАЙКАЛ.....</b>	<b>90</b>
6.1 Химический анализ воды .....	90
6.2 Таксономический состав виромов.....	92
6.3 Анализ последовательностей на уровне вида .....	98
6.4 Функциональное аннотирование генов .....	101
6.5 Анализ скаффолдов.....	102
6.6 Сравнительный анализ виромов.....	107
6.7 Анализ массивов многомерных данных физико-химических и микробиологических показателей.....	111
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>116</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>121</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>123</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>156</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Вирусы – облигатные внутриклеточные паразиты, состоящие из одной или двух молекул РНК или ДНК, заключенных в белковую оболочку (капсид), некоторые из них имеют дополнительную липидную мембранную оболочку. Вирусные сообщества водных экосистем представлены вирусами эукариот, бактерий и архей; вирусы последних двух доменов обычно называют фагами. В водной среде вирусы присутствуют как в виде свободных частиц, так и внутри клетки хозяина. Среди водных вирусов преобладают ДНК-содержащие хвостатые бактериофаги (Tapper, Hicks, 1998; Yan-Ming, Xiu-Ping, Qi-Ya, 2006).

Вирусы являются наиболее многочисленным компонентом биоты водных экосистем, их количество достигает  $10^6$ - $10^8$  частиц/мл. Они играют ключевую роль в регулировании численности и состава микробных сообществ, вызывая инфицирование и гибель микроорганизмов (Klut, Stockner, 1990; Bergh et al., 1989; Noble, Fuhrman, 1999; Proctor, Fuhrman, 1990; Weitz, Wilhelm, 2012; Wilhelm, Suttle, 1999). Вирусы принимают активное участие в биогеохимических циклах, изменяя потоки вещества и энергии. В результате «вирусного шунта» в «микробной петле» происходит отклонение части потока органического вещества от направления вверх по пищевым цепям к основанию пищевой пирамиды (Fuhrman, 1999; Weitz, Wilhelm, 2012; Wilhelm, Suttle, 1999). Велико влияние вирусов на генетическое разнообразие и эволюцию прокариот (Schwalbach, Hewson, Fuhrman, 2004).

Несмотря на признание факта, что вирусы являются важной и неотъемлемой частью микробиоценозов водных экосистем, в настоящий период имеется лишь небольшое количество работ, направленных на изучение разнообразия и структуры пресноводных вирусных сообществ, особенно в различных экотопах. В последние годы значительно возрос интерес к изучению микробных биопленок, формирующихся на различных

субстратах, на границах раздела фаз, что обусловлено их огромной ролью в биомедицинских и биотехнологических процессах. Установлено, что бактериофаги способны эффективно разрушать микробные биопленки (Harper et al., 2014; Lewis, 2007).

Первые данные о высокой концентрации вирусных частиц в воде оз. Байкал получены благодаря методу эпифлуоресцентной микроскопии (ЭФМ) (Белых, Беликов, 2000). В дальнейшем, используя электронную микроскопию, описана морфология фагов, произведена оценка их численности, сезонной и межгодовой динамики (Дрюккер, Дутова, 2006; Дрюккер, Дутова, 2009). Разнообразие клонированных последовательностей T4-подобных бактериофагов в планктоне северной и южной котловин оз. Байкал впервые описано в 2008 г. с использованием маркеров к гену капсидного белка (Бутина, Белых, Беликов, 2010).

Отсутствие универсального генетического маркера для поиска и идентификации вирусов, чрезвычайно затрудняющее изучение вирусных сообществ, вызвало необходимость использования разнообразных специфических праймеров для различных таксономических групп (Breitbart, Miyake, Rohwer, 2004; Filée et al., 2005; Fuller et al., 1998; Schroeder et al., 2002; Zhong et al., 2002).

В последние годы применение метода высокопроизводительного секвенирования позволило решить многие методические проблемы и значительно расширило возможности изучения биоразнообразия, структуры и функционального потенциала вирусных сообществ как в морских, так и в пресных водах (Gong et al., 2018; Skvortsov et al., 2016; Watkins et al., 2015).

До настоящего исследования не было сведений не только о виромах пелагиали оз. Байкал, но и о виромах других древнейших озер мира, как и о влиянии на состав и структуру вирусных сообществ абиотических и биотических факторов среды.

**Цель работы** – установление генетического разнообразия и структуры вирусных сообществ планктона, нейстона и перифитона оз. Байкал, а также количественных показателей и динамики развития планктонных вирусов в пелагиали с учетом абиотических и биотических факторов среды.

**Задачи исследования:**

1. Определить численность вирусных частиц и бактерий в планктоне пелагиали оз. Байкал методом эпифлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии (ПЦ).
2. Охарактеризовать разнообразие T4-подобных бактериофагов в различных экотопах оз. Байкал: поверхностном микрослое воды, биоплёнках каменистых субстратов и губок на основе анализа генов капсидного белка gp23 методом секвенирования по Сэнгеру, сравнить их состав с бактериофагами других природных местообитаний.
3. Определить альфа- и бетаразнообразие сообществ планктонных бактериофагов на основе метода высокопроизводительного секвенирования.
4. Установить состав, структуру и функциональный потенциал ДНК-содержащих виромов оз. Байкал и оценить их в биогеографическом аспекте.
5. Оценить экологические факторы, влияющие на количественные и качественные характеристики вирусных сообществ.

**Научная новизна работы.** Впервые проведена количественная оценка вирусных частиц и бактерий в оз. Байкал методом проточной цитометрии, определены экологические факторы, влияющие на численность микробных сообществ. Впервые выполнен анализ виромов по гену *g23* методом высокопроизводительного секвенирования. Впервые дана сравнительная характеристика генетического разнообразия *g23*-сообществ поверхностного микрослоя воды, воды и биоплёнок, сформированных на камнях и губках. Получены данные о высоком разнообразии семейства *Myoviridae*. Выявлена группа байкальских T4-цианофагов, поражающих пикопланктонные

цианобактерии. Впервые выполнено метагеномное секвенирование вирусных сообществ в пелагической зоне оз. Байкал, установлены состав и структура виромов, проведена функциональная аннотация генов. С помощью методов статистического анализа вирусных сообществ ряда водных экосистем показано, что морфометрические показатели и трофический статус водоёмов влияют на состав виромов. Установлена клада «великих озер мира». Сравнительный анализ виромов выявил их существенные различия в зависимости от физико-химических условий среды и состава бактериопланктона. Методом многомерного неметрического шкалирования показано, что наибольшее влияние на численность вирусных частиц оказывает количество бактерий и температура воды.

**Теоретическая и практическая значимость полученных результатов.** Результаты диссертационной работы существенно дополняют и расширяют имеющиеся в литературе сведения о таксономическом составе вирусных сообществ в пресноводных экосистемах и, в частности, о биоразнообразии T4-подобных вирусов семейства *Myoviridae*. Полученные в работе последовательности и массивы данных NGS зарегистрированы в базах MG-RAST, NCBI, они находятся в открытом доступе и могут быть использованы при сравнительном анализе других водоёмов. Метод проточной цитометрии, примененный для учета вирусных частиц и бактерий, а также качественного анализа проб, дал возможность с меньшими затратами времени произвести достоверную оценку микробных сообществ оз. Байкал, что позволяет рекомендовать его для мониторинга ультрамикроранктона водных экосистем.

Использованные в работе методы и подходы могут быть востребованы государственными органами РФ для биоконтроля вод оз. Байкал, выявления патогенных вирусов человека и животных. Присутствие T4-подобных фагов является косвенным подтверждением наличия условно-патогенных и патогенных бактерий, их идентификация и исследование биоразнообразия имеют значимость для санитарных служб.

**Степень обоснованности и достоверности полученных научных результатов** подтверждена использованием в качестве теоретической и методической базы трудов отечественных и зарубежных исследователей, а также воспроизводимостью полученных данных. В исследовании использованы современные методы и подходы с отработанными методиками: электронная микроскопия, выделение ДНК, амплификация со специфичными праймерами, лигирование, трансформация, секвенирование и биоинформатический анализ. Полученные нуклеотидные последовательности по методу Сенгера (85 шт.) зарегистрированы в международной БД GenBank. «Сырые» данные, полученные в результате высокопроизводительного секвенирования, депонированы в архив SRA (NCBI) под номером SRR5469168 (*g23* сообщества) и PRJNA547700 (виromы) и в базу MG-RAST (виrom): mgm4814173.3 (подлёдное сообщество), mgm4816981.3, mgm4821571.3, mgm4816982.3 (поздневесеннее сообщество). Анализ последовательностей выполнен с помощью онлайн-серверов и стандартных пакетов программ для работы с последовательностями: BLAST, Mega 7, MrBayes v. 3.2.1., QIIME v. 1.9.1, Tracer v. 1.6, CD-HIT v. 4.8.1., MG-RAST, R v. 3.5.1, SPAdes v. 3.5.0. Полученные в работе данные корректно соотносятся с результатами других авторов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Вирусные сообщества различных экотопов оз. Байкал характеризуются высоким генетическим и таксономическим разнообразием. Численность вирусов в пелагиали, их сезонная изменчивость и соотношение численности вирусов к бактериям в эпилимнионе и гиполимнионе соответствуют показателям характерным для олиготрофных озёр. Численность и состав вирусных сообществ находятся в прямой зависимости от температуры воды и численности бактерий.

2. В составе ДНК-содержащих вирусных сообществ оз. Байкал доминируют бактериофаги, принадлежащие хвостатым фагам семейств

*Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae*, среди них преобладают вирусы семейства *Myoviridae*, в том числе присутствует значительное количество литических T4-подобных бактериофагов, что свидетельствует о высокой потенциальной способности воды озера к самоочищению от бактериального загрязнения.

**Реализация и внедрение результатов исследования.** Теоретические положения и результаты исследования использованы при подготовке научных отчетов по базовому бюджетному проекту ЛИН СО РАН «Микробные и вирусные сообщества в биопленках пресноводных экосистем: таксономическое разнообразие, особенности функционирования и биотехнологический потенциал» № 0345-2019-0003 (АААА-А16-116122110061-6), а также грантам РФФИ № 10-04-01613 «а» (2010-2013 гг.), № 11-04-92220-Монг «а» (2011-2012 г.), № 14-04-90421-Укр «а» (2014-2015 гг.), № 15-34-51048 «мол\_нр» (2015-2016 гг.), № 16-54-44035. Монг\_«а» (2016-2017гг.), № 18-34-00513 «мол\_а» (2018-2019 гг.).

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа является результатом исследований автора, выполненных согласно планам научно-исследовательских работ в лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН в рамках базовых проектов и грантов РФФИ. Фактические данные получены автором при его непосредственном участии в экспедиционных и лабораторных работах, включая анализ и обобщение полученных результатов в течение 2008-2019 гг.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы представлены и обсуждены на научно-практической конференции с международным участием «Питьевая вода в XXI веке» (Иркутск, 2013), на всероссийской научной конференции «Разнообразие почв и биоты Северной и Центральной Азии» (г. Улан-Удэ, 2016), международной научно-технической конференции «Системы контроля окружающей среды» (г. Севастополь, 2016), Научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Социально-экологические проблемы

байкальского региона и сопредельных территорий» (г. Иркутск, 2018), международной конференции «Пресноводные экосистемы – современные вызовы» (г. Иркутск, 2018), международной научно–практической конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий» (г. Иркутск, 2019), 2-м Российском микробиологическом конгрессе (г. Саранск, 2019), V Международном Байкальском Микробиологическом Симпозиуме «Микроорганизмы и вирусы в водных экосистемах» (г. Иркутск, 2020).

**Публикации.** По результатам исследования опубликовано 27 научных работ, из них одна монография, 12 – входящих в действующий список ВАК, 6 – статьи в рецензируемых изданиях, включённых в систему цитирования Web of Science, 14 – тезисы конференций.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 156 страницах, содержит 11 таблиц и 25 рисунков. Список литературы включает 298 источников, из которых 24 на русском языке и 270 на иностранных языках и 4 источника интернет ресурсов.

**Благодарности.** Выражаю искреннюю признательность и благодарность научному руководителю к.б.н., доценту Ольге Ивановне Белых. Благодарю к.б.н. Т.В. Бутину, к.б.н. И.В. Тихонову, д.б.н. В.В. Дрюккера, к.б.н. А.С. Гладких, к.б.н. В.С. Муханова, А.Ю. Краснопеева, Г.В. Подлесную за ценные советы, рекомендации и неоценимую помощь при подготовке диссертации, д.г-м.н. А.П. Федотова и Н.А. Жученко за предоставленную возможность использовать данные по гидрохимическому анализу воды. Выражаю благодарность сотрудникам лаборатории водной микробиологии за помощь в организации работы, предоставление реактивов и консультации, а также сотрудникам приборного центра ЛИН СО РАН «Электронная микроскопия» и ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск),

сотрудникам лаборатории микропланктона ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь) и  
сотрудникам ЦКП ИСКЦ СО РАН (кластер «Академик В.М. Матросов»).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Общая характеристика вирусов

Термин «вирус» (лат. *virus* – «яд») широко использовался ещё в средневековой медицине, им обозначали всё опасное. Симптомы, характеризующие вирусную инфекцию, упоминаются с античности (симптомы бешенства, кори, оспы, паралитического полиомиелита и т.д.). В специальной биологической литературе патологические явления, связанные с вирусами, отражены начиная с эпохи Возрождения, главным образом, они приведены в ботанических работах, например, описание пятнистости лепестков тюльпана (Пиневич и др., 2012).

Начальной датой развития вирусологии считаются 90-е годы XIX века. В 1892 г. появилась статья Д.И. Ивановского о болезни табака, вызванной, по мнению автора, фильтрующейся бактерией либо бактериальным токсином, в 1898 г. произошло повторное открытие вируса табачной мозаики М. Бейеринком. Позднее выяснилось, что гипотеза Д.И. Ивановского о бактериальной природе возбудителя оказалась ошибочной, концепция М. Бейеринка была ближе к истине, но он сделал неверный вывод из своих работ, указав, что возбудитель табачной мозаики представляет собой «заразную живую жидкость», т.е. имеет химическую природу.

В экспериментах, приведших к косвенным открытиям вирусов табачной мозаики, ящура, желтой лихорадки, была установлена их основная характеристика – маленький размер, благодаря которому они способны проходить через фильтры, задерживающие бактерии (Waterson, Wilkinson, 1978). Вследствие методических возможностей того времени самые ранние исследования и попытки классификации вирусов были направлены на изучение их патогенных свойств, тропизма, вирулентности и т.д.

Формальной датой открытия вирусов можно считать 1939 г., когда благодаря изобретению электронного микроскопа появились первые изображения вирусов, и вышла публикация немецких вирусологов Г. Кауше, Э. Пфанкух и Х. Руска (Kausche, Pfankuch, Ruska, 1939) с описанием

морфологии палочковидного вируса табачной мозаики. В 1930-х годах с применением ТЭМ начали активно проводиться исследования ультраструктуры вирионов. В 1950-х и 1960-х годах произошел «взрыв» открытия новых вирусов. Из-за растущего количества данных по инициативе нескольких учёных и комитетов независимо друг от друга были разработаны разнообразные, нередко запутанные и противоречивые схемы классификации, которые не позволили разрешить проблемы таксономии вирусов, однако остро поставили вопрос о необходимости создания современной и единой универсальной таксономической схемы.

Бактериофаги описали несколько позднее вирусов эукариот. В 1915 г. английский бактериолог Ф. Туорт обнаружил инфицирование стафилококков неизвестным агентом, проходящим через фильтры, и показал, что им можно заражать бактерии путем переноса от одной колонии к другой (Twort, Lond, 1915). Ф. Туорт опубликовал первую научную статью по бактериофагам, однако он не был уверен, что инфицирующим агентом является вирус и высказывал предположения о живой протоплазме, либо ферменте с возможностью роста и размножения.

Ф. д'Эрель был первым кто назвал вирусы, атакующие бактерии, «бактериофагами». Он полагал, что существует только один вид бактериофага, названный *Bacteriophagum intestinale* с многочисленными расами (D'Hérelle, 1918). Впоследствии бактериофаги, поражающие большое количество разнообразных бактерий, были найдены в различных местообитаниях, и концепция существования единственного вида бактериофага оказалась несостоятельной. В дальнейшем показали разнообразие фагов и возможность их дифференцировки серологическими, фильтрационными методами, по диапазону чувствительности к фагу хозяев и тестами на устойчивость к различным разрушающим воздействиям (Burnet, 1933).

Э. Руска – создатель электронного микроскопа – в 1938 г. получил изображение вируса экстремелии мышей (семейство *Poxviridae*) и описал,

основываясь на морфологии и ультраструктуре вирионов, три типа фагов (Ruska, 1940, 1943; Ackermann, Ackermann, 2011). Позднее бактериофаги сгруппировали в отряд *Virales*, где они составили подотряд *Phagineae*, содержащий единственное семейство *Phagaceae* и один род *Phagus* (Holmes, 1948). Впервые предложил классифицировать вирусы на основе общих свойств вирионов, в частности, по морфологическим признакам Ф. Бауден (Bawden, 1950). Среди первых таксономических групп были герпесвирусы (Andrewes, 1954), миксовирусы (Andrewes, Bang, Burnet, 1955), поксвирусы (Fenner, Burnet, 1957) и несколько групп вирусов растений с палочковидными или нитевидными вирионами (Brandes, Wetter, 1959).

В первой классификации было 46 видов фагов, которые выделяли по их принадлежности к хозяину, характеру образуемой фагом бляшки и размеру вирусной частицы, а также по устойчивости к воздействию мочевины и нагреву. Однако предложенная система не была принята научным сообществом. В 1962 г. П. Турнье, А. Львов и Р. Хорн предложили классификацию, основанную на природе нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), форме капсида вируса, присутствии или отсутствии оболочки и числе капсомеров; их система, названная системой ЛНТ, включала фага φX174 и двух хвостатых фагов. Далее А. Львов с соавторами выступили за принятие общей схемы классификации вирусов по субфилам, классам, отрядам, подотрядам и семействам (Lwoff, Horne, Tournier, 1962). Нисходящие иерархические деления должны выполняться произвольно и монотетически на основе вышеназванных признаков. Альтернативное предложение в 1966 г. выдвинули А. Гиббс с соавторами, деление в их системе основывалось на нескольких критериях (политетические критерии) (Gibbs et al., 1966).

Предложенная система предполагала использование «криптограмм» (кодированные обозначения восьми вирусных признаков). В 1990-х годах, стало ясно, что семейства и роды лучше всего определять монотетически (или всего несколькими признаками), но виды лучше определять политетически (Regenmorlel Van, 1990).

В 1965 г. систему классификации, предложенную А. Львовым с соавторами, принял Временный Комитет по Номенклатуре Вирусов (PCNV), кроме того, в нее добавили фаги, содержащие одноцепочечную РНК, а также нитчатые фаги. Хвостатым фагам присвоили ранг отряда, названный Urovirales (Anonymous, 1965). Некоторые вирусологи критиковали PCNV и были против иерархической структуры и латинских названий (Gibbs et al., 1966). В качестве альтернативы предложили давать вирусам два названия, обиходное и английское и сопровождать их «криптограммой», однако название было трудно употребляемым и идею отвергли. Почти одновременно Д. Бредли предложил классификацию фагов, основанную на типе геномной нуклеиновой кислоты и общей морфологии (Bradley, 1967). Он разделил фаги на шесть основных типов (от А до F): с сократимыми, длинными несократимыми и короткими хвостами; сфероидных ДНК- или РНК-содержащих фагов, нитчатых фагов. А. Тихоненко впоследствии предложила похожую классификацию и расширила схему Бредли, включив в неё сфероидных, нитчатых и плеоморфных фагов (Тихоненко, 1968).

В 1966 г. PCNV превратился в Международный Комитет по Номенклатуре Вирусов (International Committee for Nomenclature of Viruses – ICNV) и при нём был создан Подкомитет вирусов бактерий. Хотя ICTV не принял старую схему классификации ЛНТ, он сохранил большинство установленных ею таксонов.

Первые предложения вирусологов-систематиков стимулировали интерес к разработке универсальной системы таксономии (Matthews, 1983; Wildy, 1971). В схеме, разработанной ICTV, признаки вирионов рассматриваются в качестве критериев для разделения на семейства, в некоторых случаях на подсемейства и роды. В 1970 г. утвердили шесть родов фагов, соответствующих Т-чётным фагам и группам фагов  $\lambda$ , PM2,  $\phi$ X174, MS2 и fd (Wildy, 1971). Таксономический статус существующих родов повысили до семейств и добавили ещё семь новых семейств фагов. В 1998 г. хвостатые фаги получили ранг отдельного отряда Caudovirales (Ackermann, 1998).

В настоящее время таксономическая классификация вирусов и названия вирусных таксонов находятся в ведении Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) (King et al., 2012). ICTV установлено 9 таксономических рангов: реалм, царство, филум, класс, порядок, семейство, подсемейство, род и вид.

С другой стороны, существует классификация вирусов по Дэвиду Балтимору (Baltimore, 1971), которая формально не признаётся ICTV, в ней вирусы подразделяются на семь «классов» в соответствии с типом геномной нуклеиновой кислоты: 1 – содержащие дцДНК, 2 – содержащие оцДНК, 3 – содержащие дцРНК, 4 – содержащие оцРНК(+), 5 – содержащие оцРНК(-), 6 – содержащие оцРНК(+) (геном реплицируется через стадию ДНК), 7 – содержащие дцДНК (геном реплицируется через стадию РНК).

Морфология вирусов очень разнообразна, встречаются оболочечные, безоболочечные, с хвостовым отростком, многогранные, нитчатые, плеоморфные морфотипы вирусов. По данным ICTV общее количество видов вирусов превышает 6 тыс. Примерно половина из них содержит ДНК, остальные РНК. Самой многочисленной группой являются бактериофаги (2,7 тыс. видов).

Хвостатые бактериофаги, вероятно, самые древние вирусы на Земле, их появление датировано 3,5 млрд. лет назад – приблизительно возрастом самых старых известных микробных окаменелостей (Ackermann, 2007b; Schopf, 1993). Все хвостатые фаги, принадлежащие порядку Caudovirales, классифицируют по морфологии и структуре хвостового отростка на пять семейств (по состоянию на 2019 г.): 1) *Myoviridae* с длинными, сократимыми хвостами; 2) *Siphoviridae* с длинными несократимыми хвостами; 3) *Podoviridae* с короткими несократимыми хвостами; 4) *Ackermannviridae* с икосаэдрической головкой, диаметром около 93 нм и сократимым хвостовым отростком шириной около 20 нм и длиной 140 нм; 5) *Herelleviridae* имеют морфологию миовируса, поражают представителей филума *Firmicutes*, ранее группа была родом SPO1-подобных вирусов, длина дцДНК геномов

составляет 125–170 т.п.н. Семейства порядка Caudovirales представлены 671 родом (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Electronic resource]. – URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). Семейства *Ackermannviridae* и *Herelleviridae* добавлены в 2018 году.

В первом обзоре, посвященном фагам, упоминалось 111 представителей, 99 из них были хвостатыми, три изометрическими и 9 нитчатыми (Eisenstark, 1967). Более 5500 фагов открыто с 1959 года, 96 % из них хвостатые. Оставшиеся представлены полиэдрическими, нитчатыми и плеоморфными морфотипами и принадлежат 10 семействам (Ackermann, 2007a). На рисунке 1 показана морфология 3-х основных семейств бактериофагов Caudovirales.

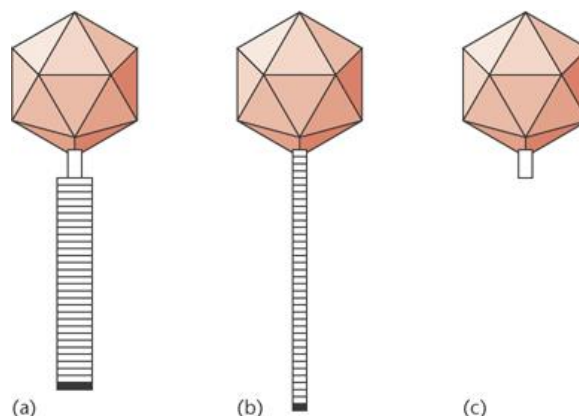


Рисунок 1 – Семейства хвостатых фагов: а – *Myoviridae*, б – *Siphoviridae*, с – *Podoviridae* (Ackermann, 2007a)

Фаг Т4, инфицирующий *E. coli*, является одним из основных модельных объектов молекулярной и структурной биологии. Капсид («головка») фага Т4 содержит геномную ДНК размером около 172 тысяч пар оснований. Капсид представляет собой удлинённый икосаэдр шириной 860 А и длиной 1200 А, он построен из 960 копий белка gp23, 55 копий gp24, 160 копий белка hoc («highly antigenic outer capsid protein») и 840 копий белка soc («small outer capsid protein») (рис. 2).

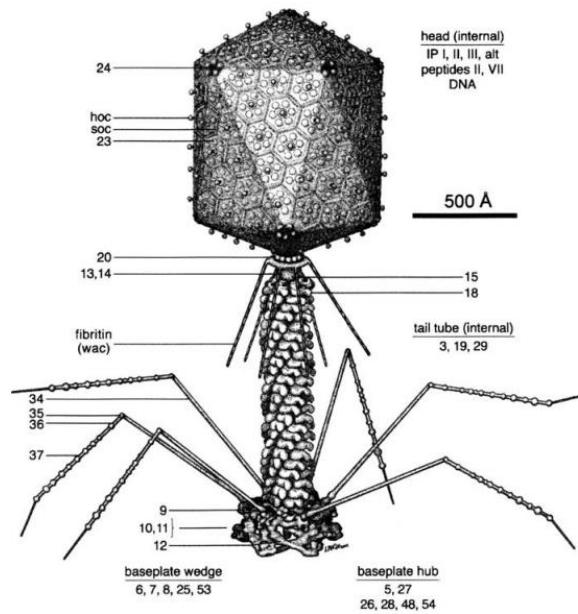


Рисунок 2 – Строение бактериофага Т4. Белки, составляющие вирион, помечены соответствующим номером или названием гена (Leiman и др., 2003)

Хвосты фагов имеют спиральную структуру или состоят из сложенных стопкой дисков из белковых субъединиц; они обычно обладают специализированными терминальными структурами, такими как базальная пластинка, шипы или фибриллы, составляющими адсорбционный аппарат вириона (Askermann, 2007b). Диаметр капсида и длина хвоста сильно варьируют. Вирионы (фаговые частицы) хвостатых фагов чаще всего состоят только из ДНК и белка. Хвостатые фаги семейств *Siphoviridae* и *Podoviridae* обычно содержат от 6 до 10 структурных белков. *Myoviridae*, как правило, более сложные, например, колифаг Т4 и *Bacillus* фаг SP01 включает 42 составных белка, около половины из них локализовано в базальной пластинке. У некоторых фагов белки присутствуют внутри капсида и, вероятно, играют роль в инъекции ДНК. Геном хвостатого фага представлен одной молекулой линейной двухцепочечной ДНК.

Бактериофаги характеризуются двумя основными способами инфицирования бактерий: литическим (вирулентным) и лизогенным (умеренным) (Askermann, 2007b). Кроме того, некоторые хвостатые фаги

иногда вызывают стойкие инфекции в гетерогенных бактериальных популяциях (частично восприимчивых и частично резистентных), такой тип носит название хронической инфекции.

Литический цикл развития включает следующие этапы: адсорбция фаговых частиц, инъекция ДНК, репликация и транскрипция, сборка фаговых частиц, выход новых вирионов. Внутри клетки различные фаги используют разные способы репликации своего генетического материала. Наиболее часто РНК-полимераза клетки транскрибирует ДНК бактериофага в мРНК, которая транслируется в ферменты (необходимые для репликации фагового генома, транскрипции и иногда разрушения ДНК хозяйской клетки), регуляторные белки (контролируют время активации фаговых белков) и структурные белки (образуют белковую часть новых копий фага). Результатом литического цикла всегда является лизис и смерть клетки-хозяина.

Умеренные фаги, проникая в бактериальную клетку, встраиваются в её геном, при этом не нарушая процессов синтеза, или существуют в виде плазмид. Встроенная ДНК фага в геном бактерии называется профагом. Умеренный фаг может долгое время находиться в клетке в виде профага и репродуцироваться вместе с ДНК бактерии. Лизогенные бактерии, содержащие ДНК профага, способны передавать фаг по наследству бесконечно долго, однако при действии неблагоприятных факторов среды (ультрафиолетовое излучение, радиация, антибиотики и т.д.), происходит индукция профага, он начинает реплицироваться как вирулентный. Во время индукции профага из бактериального генома он может захватить с собой какие-либо гены генома хозяина, располагающиеся рядом с ним. После лизиса клетки-хозяина фаг уносит эти гены и может передать их при заражении другой бактериальной клетке.

Видовое разнообразие вирусов зависит от видового разнообразия клеток хозяев. В результате плотность популяций различных вирусов колеблется в

зависимости от плотности популяций их хозяев, что и обеспечивает стабильность видового разнообразия сообществ микроорганизмов.

Помимо плотности популяций, на численность вирусов также оказывает влияние сопротивляемость клеток хозяев заражению, обеспечиваемая некоторыми системами. Например, CRISPR/Cas система, которая представляет собой механизм адаптивного иммунитета бактерий, используемый для расщепления инвазивных нуклеиновых кислот (Barrangou et al., 2007).

Сохранение восприимчивости к вирусной инфекции в бедной питательными веществами среде может быть выгодно клетке-хозяину вследствие дополнительного источника поступления нуклеиновых кислот и белков от вирусов. Но в этом случае нужно, чтобы после адгезии вируса и впрыскивания нуклеиновой кислоты инфекция каким-либо образом прервалась (эндонуклеазами рестрикции или генетическим несоответствием). В этом случае клетка бактерии получает возможность утилизировать вирусные белки и нуклеиновые кислоты.

Еще одно объяснение отсутствия широкого распространения устойчивости к вирусам состоит в том, что бактериальное сообщество сильно выигрывает от наличия вирусных инфекций, поскольку благодаря вирусам значительная часть ресурсов более крупных организмов становится доступна для микроорганизмов (Falkowski, Woodhead, 1992). Кроме того, бактерии, которые могли быть съедены консументами, вместо этого разрушаются вирусами, превращаясь в источники вещества и энергии для других бактерий.

Лизогения обычно рассматривается как стратегия выживания вируса при низкой плотности популяции хозяина. В то же время она может давать существенные преимущества клетке-хозяину, поскольку защищает ее от инфицирования другими вирусами и придает клетке новые свойства, закодированные в геноме вируса (так называемая конверсия) (Lenski, 1988). В морской и пресной воде лизогенные бактерии вполне обычны, их

численность сильно зависит от сезона и местообитания, составляя до 40% от общего числа бактериальных клеток (Cochran, Paul, 1998).

В природных условиях переход к литической инфекции может быть вызван как естественными причинами, так и воздействием наиболее распространённых загрязнителей вод: углеводов, полихлоридов, бифенилов и т.п. (Cochran, Kellogg, Paul, 1998; Jiang, Paul, 1996). Подавляющее большинство вирусов (97% и более) в морской воде появляются вследствие литической инфекции (Wilcox, Fuhrman, 1994). Однако в экспериментах естественные факторы, например, яркий солнечный свет, редко вызывают переход лизогенов к литическому циклу.

Лизогения играет значительную роль в эволюции микроорганизмов, осуществляя генетический обмен между ними. Генетический обмен может идти различными путями. Один из них – трансдукция, при которой вирус захватывает часть ДНК клетки-хозяина и передает ее новому хозяину, часто лизогену (Jiang, Paul, 1998; Ripp, Ogunseitian, Miller, 1994). Общий эффект такого обмена на больших отрезках времени сводится к перемешиванию генов у восприимчивых к вирусу хозяев. Некоторые вирусы способны к неспецифическому горизонтальному переносу генов (Chiura, 1997).

Предположительно, ДНК, высвободившаяся после лизиса, может быть передана другому организму посредством трансформации. Эти два механизма (трансдукция и трансформация) приводят к эффективному перемешиванию генов у большого числа разнообразных организмов, что имеет далеко идущие последствия в их адаптации и эволюции.

Из сказанного выше следует, что вирусы – это не инертные частицы, а весьма важный компонент в экологии водоёмов. Они влияют на многие биогеохимические и экологические процессы, являются регуляторами численности и разнообразия микробных сообществ, а также участвуют в формировании глобального климата.

**Семейство *Myoviridae*.** Среди водных фагов наиболее часто обнаруживаются и выделяются *Myoviridae* и *Siphoviridae* (Suttle, 2005).

Миовирусы имеют более широкий круг хозяев, чем другие хвостатые вирусы, они способны инфицировать различные роды бактерий (Sullivan, Waterbury, Chisholm, 2003; Wichels et al., 1998). *Myoviridae* включает 5 подсемейств и 168 родов, из которых 11 относятся к T4-подобным вирусам (ICTV [Electronic resource]. – URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). Морфология и ультраструктура T4-подобных фагов хорошо изучена (см. стр. 14).

Согласно филогенетическим реконструкциям, T4-подобные вирусы состоят из нескольких подгрупп: «истинные» T-evens, представленные бактериофагом T4 и близкородственными фагами, например, T2, T6; PseudoT-evens, SchizoT-evens и более отдалённые EchoT-evens (рис. 3) (Desplats, Krisch, 2003; Suttle, 2002).

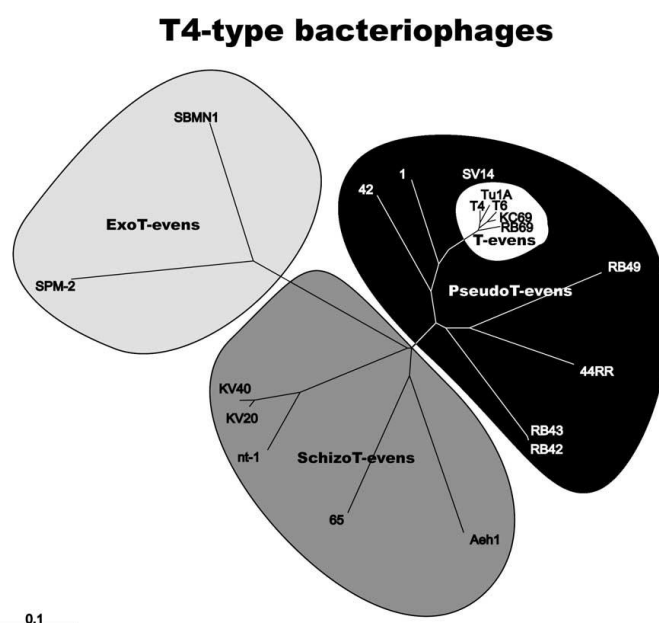


Рисунок 3 – Филогенетическая диаграмма фагов T4-типа по данным анализа генов *g18*, *g19* и *g23* (Desplats, Krisch, 2003)

Большинство штаммов, принадлежащих подгруппе T-evens, получено от энтеробактерий. Изоляты от патогенных и условно-патогенных бактерий родов *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* и *Vibrio* отнесены к подгруппам PseudoT- или SchizoT-. В подгруппу EchoT- вошли изоляты от морских

пикоцианобактерий: штаммы P-SSM2 и P-SSM4 получены от *Prochlorococcus* spp., штамм S-PM2 выделен из *Synechococcus* sp. (Wilson et al., 1993). Таким образом, род Т4-бактериофагов включает и Т4-цианофаги – вирусы цианобактерий.

Относительно недавно предложена новая классификация Т4-подобных фагов, основанная на анализе последовательностей гена *g23* морских Т4-подобных фагов (Comeau, Krisch, 2008). В соответствие с этими данными Т4-подобные фаги разделяются на три группы: Far-T4 (представлена известным культивированным бактериофагом RM378, выделенным из горячих источников, он поражает бактерии рода *Rodothermus* (Hjorleifsdottir et al., 2014), Near-T4 (группа включает T-evens, PseudoT-evens и SchizoT-evens подгруппы) и Cyano-T4 (группа представляет EchoT-evens подгруппу).

**Цианобактерии и цианофаги.** Одной из самых разнообразных и важных групп прокариот в водных экосистемах являются фотоавтотрофные цианобактерии, которые встречаются и в планктоне и в бентосе. Мельчайшие планктонные цианобактерии размером менее 3 мкм присутствуют в большом количестве в морских и пресных водах, они являются основным компонентом так называемого автотрофного пикопланктона (APP), до 98% (Stockner, Antia, 1986). Пикоцианобактерии представлены, главным образом, родами *Synechococcus* и *Cyanobium* (Stockner, Antia, 1986; Callieri, Stockner, 2002). Некоторые виды цианобактерий способны к образованию гиперпопуляций, вызывающих «цветение» водоемов.

Цианофаги, подобно другим бактериофагам, состоят из капсида, хвоста и двухцепочечной ДНК (Martin, Tyler, 1999), они многочисленны как в морских, так и в пресноводных экосистемах (Shane, 1971). Несмотря на то, что цианофаги впервые выделены из пресных водоемов, им до сих пор уделяется мало внимания в отличие от морских представителей (Fuhrman, 1999; Middelboe, Jacquet, Weinbauer, 2008; Suttle, 2005; Wilhelm, Matteson, 2008).

Существование фагов в пресноводных экосистемах доказали в 1963 г., изолировав подовирус LPP-1, инфицирующий нитчатые цианобактерии родов *Plectonema*, *Phormidium* и *Lyngbya* (Safferman, Morris, 1963). В настоящее время полагают, что цианофаги являются биологическими агентами, способными контролировать цианобактериальные «цветения» (Martin, Benson, 1988; Suttle, 2002).

Цианофаги входят в состав трех семейств: 1. *Myoviridae* – T4–подобные фаги с хвостом, отделённым от капсида «воротничком», размер генома составляет 37-200 т.п.н. (Suttle, 2002); 2. *Siphoviridae* –  $\lambda$ –подобные фаги, размер генома варьирует от 40 до 100 т.п.н.; 3. *Podoviridae* – T7–подобные фаги, например, LPP-1, SM-1 и Ma-LBP (Safferman, Morris, 1963), SM-1 инфицирует цианобактерии родов *Synechococcus* и *Microcystis*. Морские цианофаги входят в основном в семейство *Myoviridae* (Hambly et al., 2001; Suttle, 2002), в то время как *Podoviridae* и *Siphoviridae* обычно включают пресноводные цианофаги. Миовирусы и сифовирусы, как правило, вызывают литическую инфекцию, подовирусы предпочитают лизогенный путь инфекции (Suttle, 2005). Круг хозяев различен среди семейств цианофагов.

Реже встречаются цианофаги других морфотипов. Так, изолированы три нитчатых фага, инфицирующих *Microcystis*, *Anabaena* и несколько штаммов *Planktothrix* (Deng, Hayes, 2008), и бесхвостый фаг, поражающий *Planktothrix* (Gao et al., 2009).

## 1.2 Вирусы в водоёмах

### 1.2.1 Вирусы в морских экосистемах

В конце прошлого столетия с помощью ТЭМ показано, что вирусы (бактериофаги) достигают в морских экосистемах огромной численности, до  $10^6$ - $10^8$  частиц/мл (Bergh et al., 1989; Borsheim, Bratbak, Haldal, 1990; Bratbak et al., 1990). Однако уже раннее изучение вирусов превратилось в важную и независимую область морской биологии благодаря успешным экспериментам

по выделению фагов (Moebus, Nattkemper, 1981; Spencer, 1955; Spencer, 1960).

Первоначально большинство работ, посвященным морским вирусам, были направлены на изучение численности, пространственного распределения, сезонной динамики (Cochlan et al., 1993; Paul et al., 1993). Показано, что численность вирусов динамична и чувствительна к изменениям экологических условий, она коррелирует с продуктивностью водной экосистемы и тем выше, чем больше концентрация хлорофилла и бактерий (Bratbak et al., 1990; Suttle, 2005). В морях концентрация вириопланктона варьирует в зависимости от сезона, отличаясь на порядок (Bergh et al., 1989; Cochran, Paul, 1998; Jiang, Paul, 1994; Weinbauer, Peduzzi, 1995). Многими исследованиями продемонстрирована ключевая роль вирусов в функционировании морских экосистем; установлено, что они являются важными объектами в контроле численности бактерий и фитопланктона (Bergh et al., 1989; Proctor, Fuhrman, 1990). Вирусная инфекция фитопланктона приводит к сокращению первичной продукции на 78%, ежедневно в морях и океанах лизируется около 20% микробной биомассы (Suttle, Chan, Cottrell, 1990; Wommack, Colwell, 2000).

В результате исследований изменчивости вирусного сообщества в течение коротких периодов времени показано, что  $10^{23}$  бактерий инфицируется фагами каждую секунду (Suttle, 2007). Количество культивируемых фагов *Synechococcus* в Индийском океане значительно изменялось в течение суток с пиком численности в 01:00 ч (Clokic et al., 2006). Временная динамика, вероятно, определяется метаболическими процессами хозяина и скоростью распада, вызванного солнечным светом.

### **1.2.2 Вирусы в пресноводных экосистемах**

В последние десятилетия появилось множество работ по пресноводным вирусам, однако они все-таки недостаточно хорошо изучены по сравнению с таковыми в морских экосистемах. Впервые количество вирусов в пресных

водоемах оценено О. Бергом, который с помощью ТЭМ выявил, что численность вирусов в эвтрофном озере Плусс (Plussee) достигала  $2,54 \times 10^8$  частиц/мл (Bergh et al., 1989). В дальнейшем, количественный учет вирусов был выполнен в нескольких водоемах различной степени трофности с использованием, главным образом, методов электронной микроскопии.

В ультраолиготрофном озере Спроат (Канада) в 1990 г. обнаружили вирусные частицы в количестве около  $10^7$  частиц/мл (Klut, Stockner, 1990). По данным ТЭМ частицы размером от 60 до 200 нм представляли собой фаги с пяти-, шестисторонними головками и с отчётливо видимым хвостовым отростком. Фаги обнаружены как вблизи клеток бактерий, так и в тесной ассоциации с ними. На клетках цианобактерий рода *Synechococcus* наблюдали зрелые вирионы с плотной сердцевинной. Вирусных частиц было больше весной, чем в другие сезоны года. Коэффициент соотношения численности вирусы/бактерии составлял 3.

В альпийском озере Госсенкёлле в подледный период выявили пик численности вирусов с высоким отношением вирус/бактерия, второй пик приходился на начало осени, но в этом случае отношение вирус/бактерия было ниже, чем в зимние месяцы. Эти два пика, по мнению авторов, положительно связаны с хлорофиллом *a* и численностью бактерий (Hofer, Sommaruga, 2001).

В озере Верхнее большинство вирусов (70%) представлено бактериофагами. В поверхностном микрослое воды (20 мкм) вирусов наблюдалось в 2-15 раз больше, чем на глубине 20 м. Бактериопланктон преобладал по численности над свободными вирусными частицами в обоих слоях, тем самым в озере обнаружено более низкое отношение вирус/бактерия, чем в других морских и пресных водах. Наибольшую численность свободных вирусных частиц зарегистрировали в июле, а наименьшую – в августе и октябре. Бактериопланктон был также более обилен в поверхностном микрослое в июле и наименее – в августе (Tappet, Hicks, 1998).

В двух разных по трофности озёрах: олигомезотрофном оз. Павин и эвтрофном оз. Айдат (Франция), высокая численность вириопланктона и большое количество микробных таксонов выявлены в более продуктивной экосистеме (Bettarel et al., 2003). Авторы обнаружили наибольшую численность последних в период термальной стратификации в металимнионе: в сентябре в оз. Павин и в октябре в оз. Айдат. Полученные данные согласуются с другими исследованиями микробных сообществ различных озёр, где плотность гетеротрофных микроорганизмов и вирусов обычно выше в зоне термоклина (Bettarel et al., 2000; Drake et al., 1998; Weinbauer, Peduzzi, 1995). Соотношение вирус/бактерия выше в продуктивном оз. Айдат (среднее значение 9:1), чем в оз. Павин (среднее значение 7:1). Численность вирусов в двух озёрах отличалась в большей степени, чем бактерий. Авторы показали, что сезонная численность вирусов и бактерий достаточно стабильна на всех проанализированных глубинах. Сходные данные приведены Матисом с соавторами для р. Дунай (Mathias, Kirschner, Velimirov, 1995) и Хенесом с Саймоном для мезотрофного оз. Констанц (Hennes, Simon, 1995).

Соотношение вирус/бактерия показывает взаимосвязь между популяциями вириопланктона и бактериопланктона, т.е. характеризует частоту столкновения вируса с хозяином. Оно выше в пресноводных экосистемах, чем в морских (Maranger, Bird, 1995).

Важным параметром контроля вирусной инфекции является среднее количество зрелых фагов в инфицированных бактериях («Burst size»). В пресных водах этот показатель выше (28-40), чем в морских (20-25). Как правило, «Burst size» увеличивается с повышением трофности водоёма (Parada, Herndl, Weinbauer, 2006; Weinbauer, Rassoulzadegan, 2004; Wommack, Colwell, 2000).

В семи мезотрофных и эвтрофных равнинных водохранилищах Волго-Балтийского бассейна изучали количественное распределение вирусов и их роль в смертности гетеротрофного бактериопланктона. Количество

планктонных вирусных частиц находилось в пределах  $(9,4-120) \times 10^6$  частиц/мл и превышало количество бактерий в 2,5-9 раз. Продукция вириопланктона составляла  $(2,1-132) \times 10^6$  частиц/(мл сут), время оборота его численности – 0,3-11,6 суток (Копылов, Косолапов, Заботкина, 2011).

В последние два десятилетия направления вирусологических исследований сместились в сторону генетического анализа, как культивируемых штаммов, так и природных сообществ. Так, в антарктическом озере Лимнополар (Антарктика) выполнено секвенирование 20 миллионов пар оснований ДНК вирусов из проб воды и определено 5130 «весенних» генотипов вирусов, обитающих в озере до таяния ледяной шапки, и 9730 «летних» вирусов (López-Bueno et al., 2009). В виrome идентифицировано 12 семейств, в то время как в других водных средах обитания насчитывали не более 3-6 вирусных семейств. Бактериофаги в озере Лимнополар не являлись доминирующей группой вирусов в отличие от других водных экосистем. Весной преобладали вирусы с одноцепочечной ДНК, в то время как вирусы Caudovirales с двухцепочечной ДНК были вторыми. Летом, после таяния льда, в массе присутствовали вирусы с двухцепочечной ДНК, принадлежащие семейству *Phycodnaviridae*, хотя вирусы из отряда Caudovirales и семейства *Mimiviridae* также встречались.

В последнее время исследователи уделяют много внимания метагеномному анализу пресноводных вирусных сообществ. При этом возникает проблема присутствия в виромах последовательностей, которые определяются по базам данных как бактериальные, несмотря на этапы по удалению бактериальной ДНК и огромный пул неидентифицированных последовательностей (Mohiuddin, Schellhorn, 2015; Skvortsov et al., 2016; Watkins et al., 2015).

Огромное разнообразие и повсеместная распространённость вирусов в водных экосистемах (как в морских, так и в пресноводных), а также их различные функции, свидетельствуют об их экологической важности в функционировании водоёмов. Недостаточность изученности вирусов в

пресноводных экосистемах открывает огромное поле для исследования этих самых многочисленных биологических объектов.

### **1.2.3 Вирусы – активные компоненты трофических цепей водных экосистем**

Водные вирусы наряду с бактериями, флагеллятами и инфузориями являются основными компонентами планктонных микробных пищевых цепей («микробная петля») – участка трофической цепи, ответственного за циркуляцию растворимого органического вещества (РОВ) (Azam et al., 1983; Fuhrman, 1999). Значительную часть РОВ, образующегося в результате первичной продукции фитопланктона внутри водоема и поступающих извне, потребляют гетеротрофные бактерии, что приводит к увеличению их численности и биомассы, т.е. бактерии переводят РОВ во взвешенную форму, доступную другим гидробионтам (Cole, Findlay, Pace, 1988). В свою очередь, литическая вирусная инфекция вызывает гибель бактерий, продукты распада которых представляют собой пул коллоидных и клеточных фрагментов, неорганических и органических соединений, большинство из них определяется как РОВ (Shibata et al., 1997). Известно, что в пресных водоемах 5-26% бактерий инфицированы фагами и от вирусной инфекции погибает до 45% бактерий.

Таким образом, продукты деструкции лизированных клеток, особенно высоколабильное РОВ, высвобождаясь в водную среду, вновь активно потребляются «здоровыми» гетеротрофными бактериями и остаются внутри микробного сообщества, образуя дополнительный «вирусный шунт», который лишает верхние звенья трофической цепи притока РОВ (Bratbak и др., 1990; Falkowski, Woodhead, 1992; Proctor, Fuhrman, 1990). Увеличение численности бактерий и вирусов и накопление РОВ вызывает обогащение эуфотической зоны водоёмов доступными биогенными элементами, в частности углеродом, азотом, фосфором. В отсутствие «вирусного шунта» увеличивается численность более крупных организмов (метазойного

планктона), которые быстрее, чем компоненты микробной петли, оседают на дно и выводят, таким образом, питательные вещества из поверхностных слоев. Бактерии потребляются гетеротрофными флагеллятами, выедаемые инфузориями, простейшие, в свою очередь, используются метазойным планктоном в качестве источника пищи, в результате вещество и энергия поступают на более высокие уровни трофической сети (Berninger et al., 1991; Sanders, Caron, Berninger, 1992). Простейшие являются переходным звеном между микробной трофической сетью и классической пастбищной линейной цепью (Carrick et al., 1991).

Вирусы влияют не только на численность бактериальных сообществ, но и на их видовое разнообразие. Даже если вирусы приводят к незначительному увеличению смертности организмов, они могут оказывать существенное влияние на относительную численность различных видов организмов в сообществе (Hennes, Suttle, Chan, 1995; Waterbury, Valois, 1993). Поскольку вирусы перемещаются пассивно, они чаще заражают клетки, плотность которых выше. Поэтому редко встречающийся вид-хозяин менее подвержен инфекции, чем более распространенный.

При увеличении плотности популяции какого-либо вида-хозяина численность литического вируса начнет расти, если время, необходимое для случайной встречи вируса с клеткой-хозяином, в среднем меньше времени, в течение которого вирус сохраняет инфекционную способность. Сказанное выше позволяет решить так называемый «парадокс Хатчинсона» (Hutchinson, 1961): каким образом в системе с малым числом лимитирующих ресурсов стабильно сосуществует большое число различных видов фитопланктона, ведь теоретически должен был бы остаться лишь один, наиболее конкурентоспособный вид. На самом деле вид, имеющий преимущества перед другими и начавший быстро размножаться, становится особенно восприимчивым к вирусной инфекции, которая и ограничивает его численность (Fuhrman, Suttle, 1993).

### 1.3 История изучения вирусов на Байкале

Первые исследования вирусов оз. Байкал посвящены РНК-содержащим вирусам. В результате комплексного изучения с использованием генетических и морфологических методов раскрыта причина заболевания тюленей оз. Байкал (*Phoca siberica*) осенью 1987 года. Показано, что массовая гибель тюленей вызвана морбилливирусом (сем. *Paramyxoviridae*) сходным с вирусом чумы собак (CDV) (Grachev et al., 1989; Likhoshway et al., 1989; Belykh et al., 1997).

В 1998 г. детектированы коли-фаги оз. Байкал и его притоков (Дрюккер, Масленников, 1998). В 2000 г. получены первые данные о наличии и высокой концентрации вирусоподобных частиц в оз. Байкал ( $5,9 \times 10^6$  мл<sup>-1</sup>) с помощью специфического окрашивания и флуоресцентной микроскопии (Белых, Беликов, 2000).

Бактериофаги впервые обнаружены методом трансмиссионной электронной микроскопии в период с 2003 по 2006 гг. В пробах воды, взятых с поверхности озера и до глубины 1400 м, определены морфологический состав фагов, их размерный спектр, сезонная и межгодовая динамика численности. Установлено большое разнообразие морфотипов бактериофагов, среди которых доминировали представители порядка *Caudovirales* (76%), из них: *Siphoviridae* – 56%, *Podoviridae* – 13%, *Myoviridae* – 7% (Дрюккер, Дутова, 2006; Дрюккер и др., 2008; Дрюккер, Дутова, 2009).

В дальнейшем были описаны морфологические особенности и размерная структура бактериофагов природных биоплёнок, развивающихся на природных геологических породах и искусственных субстратах (Dutova, Drucker, 2013). В поверхностном микрослое воды обнаружено значительное разнообразие морфотипов. В отличие от воды, в нейстоне основную часть фаговых сообществ составляли бесхвостые бактериофаги, предположительно, семейств *Microviridae*, *Leviviridae*, *Tectiviridae*. Доля подовирусов достигала 25%, представители семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae* были немногочисленны – около 10%. Численность

бактериофагов в нейстоне варьировала от 0,05 млн частиц/мл до 0,16 млн частиц/мл (Дрюккер и др., 2015).

В 2010 г. в озере Байкал впервые определено генетическое разнообразие T4-подобных бактериофагов по гену основного капсидного белка gp23 (Butina et al., 2010), позднее по гену *g20* в планктоне (Бутина и др., 2012) и в теле эндемичной губки *Lubomirskia baicalensis* (Бутина и др., 2015).

В этот же период расшифрованы полные геномы бактериофагов MD8 *Pseudomonas aeruginosa* (*Siphoviridae*) и *P. aeruginosa* PaBG (*Myoviridae*), выделенных из планктона озера (Sykilinda et al., 2014; Дрюккер и др., 2015). У них идентифицированы белки, ответственные за узнавание рецепторов и деградацию клеточных стенок, а также участвующие в формировании хвоста и в упаковке ДНК. Полная последовательность генома гигантского бактериофага *P. aeruginosa* PaBG включала 258139 п.н. двухцепочечной ДНК, содержащей 308 предсказанных открытых рамок считывания (Sykilinda и др., 2014).

В последние годы выяснено генетическое разнообразие вирусов в ассоциированном сообществе «больной» эндемичной губки *Lubomirskia baicalensis* с использованием метагеномного анализа. Впервые показано высокое генетическое и таксономическое разнообразие ДНК-вирусов в микробном сообществе «больной» губки. Идентифицированные последовательности принадлежали 16 вирусным семействам, которые заражают широкий спектр организмов (Butina et al., 2019a). Также таксономический анализ вирусных сообществ путём метагеномного секвенирования был проведён в литоральной части озера (Butina et al., 2019b).

#### **1.4 Молекулярно-генетические исследования водных бактериофагов**

Принимая во внимание трудности изоляции водных вирусов, многие вирусологи используют не связанные с культивированием молекулярные

методики. Так как вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, то для многих исследований требуется выделение и культивирование их хозяев, что вызывает ряд сопутствующих проблем. Не связанные с культивированием методики позволяют их обойти, предоставляя возможность охарактеризовать вирусные сообщества напрямую.

Вирусы – самые разнообразные биологические объекты в биосфере. Несмотря на то, что они не имеют универсальных маркерных генов (подобных 16S и 18S рибосомальным РНК прокариот и эукариот, соответственно), многие исследования демонстрируют, что некоторые гены являются консервативными среди определенных групп вирусов. С помощью маркерных генов установлено, что вирусы в морских экосистемах намного более разнообразны, чем можно было ожидать, основываясь на ограниченном количестве культивируемых вирусов (Short, Chen, Wilhelm, 2010). Так, с применением метагеномного подхода для анализа сообществ прибрежных вод (Breitbart et al., 2002) и осадков (Breitbart et al., 2004), показано, что существует несколько тысяч вирусных генотипов в 200 литрах морской воды и миллион – в 1 килограмме осадков, среди них преобладали последовательности, принадлежащие хвостатым фагам (Breitbart, Rohwer, 2005).

На сегодняшний день существуют огромные базы данных последовательностей, например, NCBI GenBank (Benson et al., 2005). Методы, основанные на ПЦР, обладают достаточно высокой чувствительностью, позволяют быстро и экономично исследовать разнообразие вирусных генов или вирусных групп в природе и ответить на наиболее важные вопросы о распространении, разнообразии и даже активности вирусов в водных экосистемах.

В настоящее время гены, кодирующие белки капсида и ДНК, РНК полимеразные гены, являются наиболее широко используемыми мишенями для изучения водных вирусов водных экосистем (Breitbart, Miyake, Rohwer, 2004; Filée et al., 2005; Fuller et al., 1998; Millard et al., 2004; Wang, Chen, 2008;

Zeidner et al., 2009). Ген *g20* Т4-подобных вирусов участвует в морфогенезе, он кодирует минорный капсидный белок *gp20* ответственный за начало сборки головы (Driël van, Couture, 1978), упаковку ДНК (Hsiao, Black, 1978) и за связь с хвостовым отростком (Coombs, Eiserling, 1977).

У трёх генетически различных цианофагов семейства *Myoviridae*, инфицирующих морские штаммы *Synechococcus*, идентифицировали консервативный участок генома (Fuller et al., 1998). Этот участок имеет значительное сходство с геном, кодирующим сборочный капсидный белок *gp20* колифага Т4. Результаты сравнения сходных последовательностей, полученных из трёх цианомиовирусов и Т4 фага, позволили авторам спроектировать вырожденные праймеры CPS1 и CPS2, амплифицирующие участок в 165 п.н.. Они также дали возможность идентифицировать цианомиовирусы напрямую из морской воды. Эти праймеры впоследствии были применены для изучения разнообразия цианофагов вдоль трансекты Атлантического океана, используя метод ДГГЭ (денатурирующий градиентный гель-электрофорез) (Wilson et al., 1999; Wilson et al., 2000). Высокое генетическое разнообразие последовательностей *g20* обнаружено как в поверхностных, так и в глубинных слоях водоёмов. Структура природных цианофаговых сообществ значительно менялась от поверхности к глубине и максимум разнообразия всегда совпадал с максимумом численности *Synechococcus* sp. (Wilson et al., 2000).

Позднее, Я. Зонг и Ф. Чен использовали праймеры CPS1 и CPS8 для исследования разнообразия цианофагов (Zhong et al., 2002). Фрагмент гена *g20* фланкируемый этими праймерами состоит из 592 п.н., что ведёт к более верным филогенетическим оценкам по сравнению с праймерами CPS1 и CPS2. Праймеры CPS1 и CPS8, применённые к широкому диапазону цианофагов и бактериофагов, могут амплифицировать фрагмент гена *g20* только цианофагов, принадлежащих семейству *Myoviridae*.

Праймеры на основе гена *g23* (MZIA1bis и MZIA6), разработанные Д. Филе с соавторами, позволили идентифицировать широкий спектр Т4-

бактериофагов, в том числе T4-цианофагов в природных образцах (воды, почвы и др.) (Filée et al., 2005). Ген *g23* кодирует основной капсидный белок *gp23*, присутствующий во всех T4-подобных фагах. Длина гена вариабельна, она составляет 1563 п.н. у T4 бактериофага (Parker et al., 1984) и 1371-1410 п.н. у цианомиовирусов (Millard et al., 2009). Как полагают, среди структурных генов, ген *g23* служит наиболее надёжным маркером для выявления разнообразия T4-подобных фагов (Desplats et al., 2001). В результате исследования *g23* генов некультивированных T4-бактериофагов водных биоценозов установлено, что T4-фаги имеют очень широкое распространение в природе и обладают большим генетическим разнообразием. По итогам генетического изучения выделено 5 подгрупп морских (Marine groups I-V) T4-фагов (Filée et al., 2005).

Позднее проведён анализ *g23* гена T4-подобных бактериофагов рисовых полей Японии (Fujii et al., 2008; Jia et al., 2007; Wang et al., 2009b) и Китая (Wang et al., 2009a). Последовательности гена *g23* из японских рисовых полей разделены на 6 новых субгрупп (Paddy groups I–VI), более того Г. Ванг с соавторами определил три дополнительных T4 группы, основываясь на анализе *g23* гена библиотек клонов, выделенных из проб рисовых полей. На основе полученных данных сделан вывод о вариабельности генов *g23* по длине в образцах из морских и почвенных экосистем, что вероятно, отражает высокое разнообразие фаговых сообществ в этих экосистемах.

### **1.5 Исследование гена *g23* с использованием высокопроизводительного секвенирования**

В последнее время для анализа вирусных сообществ в водоемах используется высокопроизводительное секвенирование маркерных генов, в том числе генов *g23* (Cárcer de et al., 2016; Millard, Pearce, Zwirgmaier, 2016; Tian, 2015). Так, методом HTS изучен состав сообществ T4-подобных фагов в Английском заливе (Канада), в результате выявлено более высокое

биоразнообразии вирусов по сравнению с данными, полученными ранее секвенированием по Сенгеру (Tian, 2015). Таргетное исследование группы Far-T4 проведено С. Роуксом с соавторами, взяв ген *g23* из полученных последовательностей вирома, учёные более детально рассмотрели эту неоднозначную группу (Roux et al., 2015). При анализе вирусных сообществ по гену *g23* из озёр Арктики и Антарктики выявлены различия в составе сообществ экосистем полюсов, при этом количество общих ОТЕ из арктических и антарктических озёр было значительным, что указывает на распространение общих ОТЕ по миру (Cárcer De et al., 2016). Изучая популяции бактериофагов в четырех гидротермальных источниках в море Скоша, проливе Брансфилд, сделано заключение об уникальных сообществах фагов в каждом экотопе, что отражает различия не только химического состава источников, но и хозяев этих фагов, присутствующих в том или ином источнике. Авторы сравнили сообщества из гидротермальных источников с сообществами из других экосистем и отметили явную обособленность кластеров из гидротерм (Millard, Pearce, Zwirgmaier, 2016).

## 1.6 Метагеномные исследования вирусных сообществ

Виром (метагеном вирусного сообщества) даёт лучшее представление о сообществе вирусов. Увеличение количества метагеномных данных за последнее десятилетие выявило огромное разнообразие вирусов (Brum, Sullivan, 2015; Paez-Espino et al., 2016). Морской виром считается самым большим пулом неизученного генетического разнообразия на земном шаре: 63-93% последовательностей не представлены в общедоступных базах данных (Hurwitz, Sullivan, 2013). До недавнего времени основное внимание вирусологов было уделено морским виромам, пресноводные виromы оставались менее изученными. Первой работой по пресноводным вирусам стало исследование вирусных сообществ в прудах для разведения рыб (Dinsdale et al., 2008). Впоследствии охарактеризованы РНК-виromы из озера Нидвуд (Мэриленд, США) (Djikeng et al., 2009), изучено разнообразие

вирусов в озере Лимнополар (Антарктида) (López-Bueno et al., 2009). Метагеномные исследования вирусов проведены на двух участках аквапредприятия (Rodriguez-Brito et al., 2010), в двух озёрах Франции – Бурже и Павин (Roux et al., 2012), в четырех пресных водоемах, расположенных в пустыне Сахара (Fancello et al., 2012), а также на водохранилище Фейсьюй на севере Тайваня (Tseng et al., 2013). В 2013 г. Ш. Ге с соавторами выполнили метагеномный анализ виромов оз. Восточное (Китай) и выявили высокое генетическое разнообразие вирусов (Ge et al., 2013). Изучено четыре арктических озера на архипелаге Шпицберген и девять антарктических озер. Авторами выявлено различие между арктическими и антарктическими ДНК-вирусами. В арктических виромах преобладают одноцепочечные ДНК-вирусы, большинство вирусов осталось не идентифицированными. Авторы делают заключение, что распределение вирусов не соответствует градиенту широтного разнообразия (Cárcer De et al., 2015). В результате исследования озера Матока (Вирджиния, США) авторы подтверждают отличие вирусных сообществ пресных водоемов от таковых в других экосистемах. На основе анализа проб из разных участков озера (подверженных антропогенному влиянию и фоновых) они сообщают о меньшем количестве генотипов в загрязненных районах и говорят о том, что антропогенные воздействия могут снизить видовое богатство (Green et al., 2015). Анализ виромов озёр Онтарио и Эри показал, что географическое положение не оказывает существенного влияния на видовое обилие и разнообразие, поскольку виромный состав обоих озёр был схожим (Mohiuddin, Schellhorn, 2015). При анализе девяти виромов из олиготрофного озера Мичиган большинство последовательностей не имело существенного сходства с последовательностями из базы данных NCBI RefSeq, только 6,9% имело  $score \geq 50$ . 95% белковых хитов принадлежало кодирующим регионам двухцепочечным ДНК вирусам, при этом 65% из которых составлял порядок Caudovirales. Анализ контигов выявил, что большая часть (Open Reading Frame, ORF) была аннотирована как «гипотетический белок» (Watkins et al.,

2015). В озере Лох-Ней (Северная Ирландия), как и в большинстве проведённых до этого метагеномных анализах, 85% вирома не имело гомологов в базах данных (Skvortsov et al., 2016).

В реке Амазонка и её эстуарии вирусы эукариот встречались в основном в реке, в то время как в эстуарии было больше фагов автотрофных (*Prochlorococcus*, *Synechococcus*) и гетеротрофных бактерий (*Pelagibacter*). Представители семейств *Microviridae* и *Myoviridae* оказались наиболее многочисленными, они присутствовали по всех образцах (Silva et al., 2017).

В исследовании виромов Капшагайского водохранилища, оз. Балхаш и р. Или (Казахстан) было выявлено доминирование дцДНК вирусов, принадлежащих сем. *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Phycodnaviridae* и *Mimiviridae* и показано, что состав виромов отличался в количественном аспекте, а не в качественном (Alexyuk et al., 2017).

В меромиктическом мезотрофном озере Шунет (Хакасия) идентифицировано 14 семейств, среди них преобладали вирусы семейства *Siphoviridae*. Виромная проба характеризовалась высоким разнообразием, обнаружено от 2498 до 15877 генотипов. Также присутствовали вирусы семейства *Plasmaviridae*, которые до этого исследования были найдены только в антарктических озёрах (Wu et al., 2018).

## 1.7 Анализ $\beta$ -разнообразия сообществ

Метрика Unifrac – это метод вычисления различий между микробными сообществами, в основе которого лежат филогенетические данные и многомерные статистические техники (Lozupone, Knight, 2005). Изначально UniFrac применяли как метод для характеристики бактериальных сообществ с использованием обширного количества мировых данных о структуре генов 16S рРНК из различных биоценозов. С помощью этого метода продемонстрировано влияние абиотических факторов (соленость, субстрат, рН и др.) на формирование природных бактериальных сообществ (Lozupone, Knight, 2007). Авторы поддержали гипотезу о том, что географическое

положение играет минимальную роль в структурировании бактериальных сообществ (Lozupone, Knight, 2005).

В дальнейшем этот метод стал широко применяться для исследования микробных сообществ, включая бактерии (Lozupone, Knight, 2008), археи (Harrison et al., 2009), вирусы (Butina et al., 2013; Zheng et al., 2013).

Метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA) (Sneath, Sokal, 1973) часто используется для иерархического кластерного анализа. Для создания дендрограммы требуется матрица сходства (или различия), которая определяет уровень сходства между парами кластеров. Перед началом работы алгоритма рассчитывается матрица расстояний между объектами. На каждом шаге в матрице расстояний ищется минимальное значение, соответствующее расстоянию между двумя наиболее близкими кластерами. Расстояние между кластерами вычисляется как среднее арифметическое всевозможных расстояний между последовательностями из кластеров.

Функция `hclust` применяется в R для проведения иерархической кластеризации. В ней используются разные методы, например UPGMA или WPGMA и др.

Неметрическое многомерное шкалирование (Nonmetric multidimensional scaling, NMDS) и метод главных компонент (principal component analysis, PCA) являются методами ординации, представляют собой нахождение таких координатных осей на плоскости, относительно которых можно выполнить оптимальное проецирование многомерных анализируемых объектов.

## 1.8 Проточная цитометрия

Благодаря использованию эпифлуоресцентной микроскопии с окраской нуклеиновых кислот красителями 4,6-диамидино-2-фенилиндола дигидрохлорид (DAPI), SYBR Green стало возможным проводить учёт вирусов менее трудо- и материалоемко по сравнению с ТЭМ (Hara, Terauchi,

Koike, 1991; Noble, Fuhrman, 1998; Weinbauer et al., 1997). Подсчёт вирусов с помощью ЭФМ даёт аналогичные или немного завышенные результаты (1-1,5 раза), чем при ТЭМ-наблюдении (Noble, Fuhrman, 1998). Вирусы, окрашенные красителем SYBR Green I, могут быть также подсчитаны с помощью проточной цитометрии (ПЦ) (Marie et al., 1999).

Проточная цитометрия как современная технология быстрого измерения характеристик клеток, направленная в сторону их автоматизации, появилась в результате естественного развития традиционных гистохимических и цитохимических методов анализа.

Разработка красителей чувствительных к нуклеиновым кислотам в комбинации с техниками ПЦ, позволила распознать и подсчитать вирусы в водных экосистемах. Традиционно вирусы учитывали методом, основанном на культивировании (например, учёт бляшек), и ТЭМ (Bergh et al., 1989; Katano et al., 2008; Waterbury, Valois, 1993). Эти методы имели свои недостатки, такие как сложность культивирования, трудоемкость, дороговизна. Внедрение флуоресцирующих красителей специфичных к нуклеиновым кислотам в комбинации с ЭФМ (Hara, Terauchi, Koike, 1991; Noble, Fuhrman, 1998) значительно улучшило процесс учёта вирусов. С относительно недавним введением в практику выявления свободных вирусных частиц с помощью ПЦ скорость анализа и точность учёта были многократно увеличены (Marie et al., 1999; Parada et al., 2007). Этот метод не требует высококвалифицированного оператора как, например, ТЭМ. Сравнение данных, полученных с помощью ЭФМ и ПЦ, показывает высокую корреляцию результатов (Brussaard et al., 2010; Marie et al., 1999). К. Бруссаард в своём исследовании показала, что разнообразие вирусов различной морфологии и размера генома может быть исследовано с помощью ПЦ. В сочетании с флуорохромом SYBR Green I, ПЦ успешно используется в количественном определении вирусов.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Объекты исследования

Объектом исследования явились вирусы, в частности, Т4-подобные бактериофаги семейства *Myoviridae* озера Байкал.

#### Отбор и фиксация проб

Для количественной оценки вирусных частиц и бактерий методом ЭФМ пробы отбирали с 2011 по 2016 гг. в южной котловине оз. Байкал в сентябре на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой от поверхности до глубины 25 м на горизонтах 0, 5, 10, 15, 25 м.

Пробы воды для сравнительного анализа численности вирусных частиц и бактерий методами ПЦ и ЭФМ отбирали в сентябре 2012 г. на центральных станциях разрезов пос. Маритуй – пос. Солзан, пос. Листвянка – пос. Танхой, м. Кадильный – пос. Мишиха от поверхности до глубины 1200 м на горизонтах 0, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 м. Для ЭФМ пробы воды объёмом 100 мл помещали в стерильные контейнеры и фиксировали формалином (2% конечная концентрация). Для учёта на проточном цитометре пробы объёмом 5 мл сразу после отбора замораживали в жидком азоте, а затем хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для исследований генетического разнообразия бактериофагов в различных экотопах пробы отбирали в 2016 г. и 2017 г. в южной котловине оз. Байкал, а также в проливе Малое Море. Пробы биоплёнок зеленого цвета взяты с поверхности камней в урезовой зоне (глубина 1 м) около пос. Листвянка (LS). Три пробы биопленок бордово-фиолетового цвета собраны с поверхности камней водолазами-исследователями вблизи пос. Большие Коты (2а) и в районе м. Толстый (1D3Тр, 2D1) с глубин 6 м, 9 м, 36 м, соответственно. Образцы губок *Rezinkovia* sp. (2D 4-1) и *Swartschewskia papuracea* (2D 2-1) взяты в районе м. Толстый водолазами-исследователями с

глубин 20 и 35 м, соответственно. Пробы из поверхностного микрослоя воды отобраны напротив мыса Хобой (пр-в Малое Море).

Для анализа *g23*-сообществ методом высокопроизводительного секвенирования образцы отбирали в августе 2013 г. на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой на глубине 0-100 м. Предварительно пробы объёмом 50 мл фильтровали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, США) для удаления зоо-, фито- и бактериопланктона. Фильтрат служил матрицей для дальнейшего анализа.

С целью получения виромных образцов пробы объёмом 25 л взяты в 2018 году 22 марта в 7 км от пос. Листвянка (BVP1), 8 июня в 3 км от пос. Листвянка (BVP2), 31 мая в 3 км от пос. Турка (BVP3), 4 июня в 3 км от м. Елохин (BVP4), 5 августа на центральной станции в проливе Малое Море (BVP5) и 27 сентября на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой (BVP6). С каждого горизонта (0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 м) отбирали по 3,5 л и смешивали для получения интегральной пробы слоя 0-50 м.

Отбор проб проводили на научно-исследовательских судах ЛИН СО РАН с помощью системы батометров SBE-3 (Carousel Water Sampler, Sea Bird Electronics Inc, США). В подлёдный период пробы отбирали со льда с помощью батометров Нискина. Карта станций отбора проб приведена на рисунке 4.

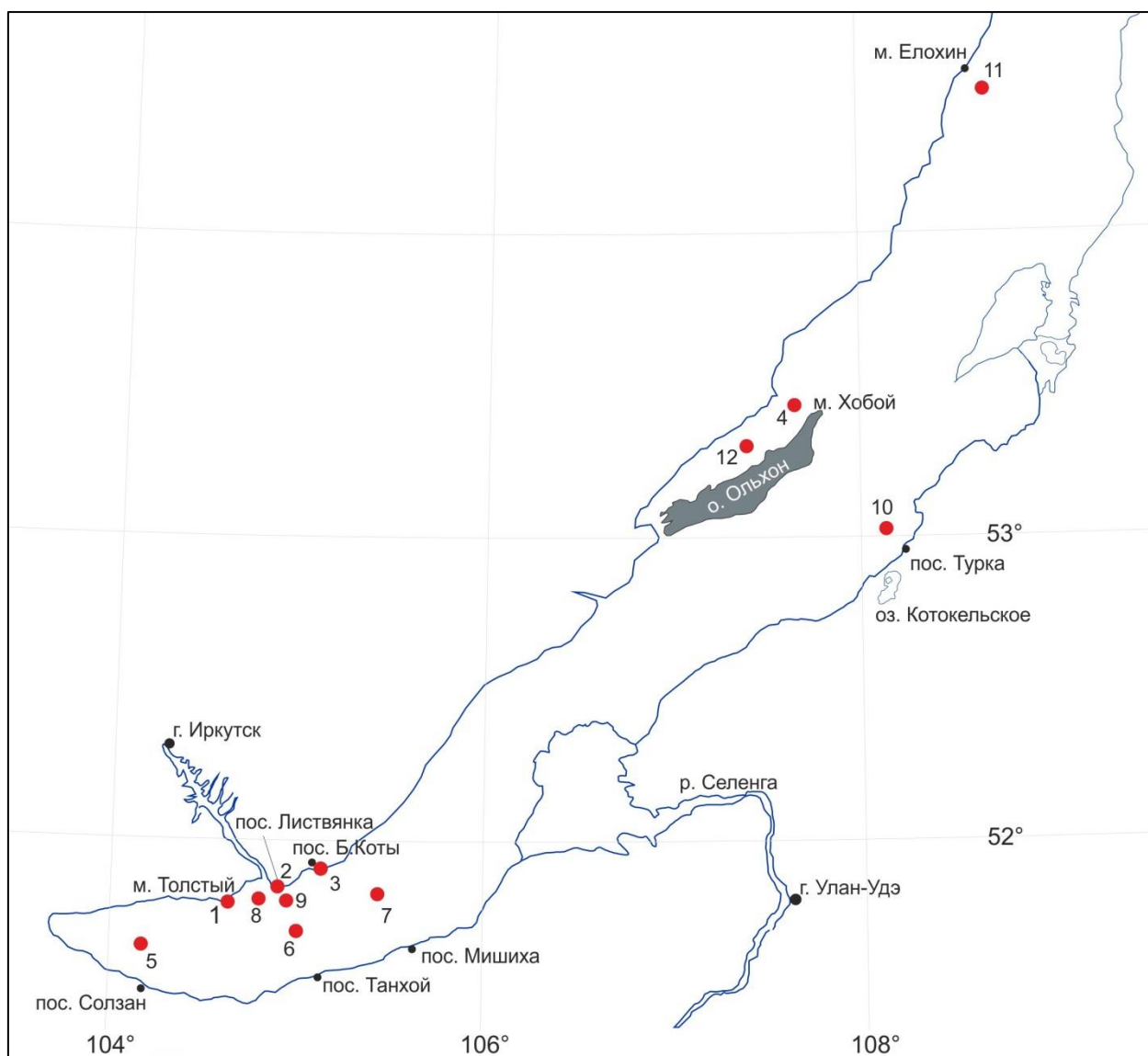


Рисунок 4 – Карта-схема станций отбора проб в оз. Байкал. 1 – м. Толстый, 2 – пос. Листвянка, 3 – пос. Б. Коты, 4 – м. Хобой (пролив Малое Море), 5 – центральная станция разреза пос. Маритуй – пос. Солзан, 6 – центральная станция разреза пос. Листвянка – пос. Танхой, 7 – центральная станция разреза м. Кадильный – пос. Мишиха, 8 – 7 км от пос. Листвянка, 9 – 3 км от пос. Листвянка, 10 – 3 км от пос. Турка, 11 – 3 км от м. Елохин, 12 – центральная станция пролива Малое Море. 1-3 – биопленки камней и губок; 4 – проба из поверхностного микрослоя (ПМС), 5-12 – пробы воды

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1 Химический анализ воды**

Водородный показатель (рН) определяли потенциометрическим методом на рН-метре Эксперт-рН (Эконикс-Эксперт, Россия). Содержание биогенных элементов определяли фотометрическим методом на фотоколориметре КФК-2 (ЗОМЗ, Россия): нитрат-ион – с использованием салициловокислого натрия по ГОСТ 33045-2014 (Д), нитрит-ион – с реактивом Грисса по ГОСТ 33045-2014 (Б), кремний – с образованием жёлтой кремнемолибденовой гетерополиокислоты по ПНД Ф 14.1:2:4.215-06, фосфат-ион – с образованием фосфорно-молибденового комплекса синего цвета по ГОСТ 18309-2014 (А). Содержание общего фосфора также определяли фотометрическим методом на фотоколориметре КФК-2 (ЗОМЗ, Россия) после персульфатного окисления по ГОСТ 18309-2014 (Г). Содержание общего азота определяли персульфатным окислением в щелочной среде по п. 3.6.2. (Аналитические, кинетические и расчетные методы в гидрохимической практике, 2017) на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ (Экохим, Россия). Содержание общего органического углерода – методом высокотемпературного окисления на анализаторе общего органического углерода Vario TOC cube (Elementar, Германия).

Концентрацию кислорода, температуру измеряли с использованием зонда SBE 25 Sealogger CTD (Sea-Bird Electronics, Белвью, Вашингтон, округ Колумбия, США).

### **2.2.2 Определение концентрации хлорофилла**

Для определения концентрации хлорофилла 1 л воды фильтровали через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 0,4 мкм (Millipore, США). После ультразвуковой обработки образцов выполняли экстракцию ацетоном (90%) в течение ночи в темноте при 4°C. Супернатант центрифугировали. Концентрацию хлорофилла *a* измеряли с помощью спектрофотометра Cintra-

2020 при 664, 647 и 630 нм и рассчитывали на основе уравнений, представленных (Parsons, Maita, Lalli, 1984).

### **2.2.3 Эпифлуоресцентная микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия, проточная цитометрия**

**Эпифлуоресцентную микроскопию** использовали для количественной оценки вирусных частиц и бактерий. Пробы для учёта вирусных частиц окрашивали флуоресцентным красителем SYBR Green I (Molecular Probes, США). Препараты наблюдали, применяя синий фильтр ( $\lambda = 450$  нм), согласно методике, опубликованной ранее (Noble, Fuhrman, 1998). Для подсчета численности бактерий использовали DAPI и УФ-фильтр (390-440 нм) (Porter, Feig, 1980). Цианобактерии выявляли по автофлуоресценции фикобилинов, используя зелёный свет для возбуждения флуоресценции ( $\lambda = 510-550$  нм). Подсчёт вирусов и бактерий производили на микроскопе Axio Imager M1 (Zeiss, Германия), снабженном ртутной лампой HBO 100W и камерой AxioCam (Pixera Corp., США), с применением объектива 100 кратного увеличения.

Микрофотографии получали с помощью программы Axio Vision, версия 4.7.2.0. С целью автоматизации и сокращения времени работы выполняли микрофотографирование полей зрения. Снимали 20 полей зрения, выбранных случайным образом. Затем полученные снимки анализировали на компьютере, используя программу ImageTest версия 1.0 (Дроздов и др., 2006). Высчитывали среднее количество вирусов и бактерий в поле зрения с помощью формулы:

$$x = \frac{l \times 10^6 \times g}{a \times m \times z},$$

где  $l$  – площадь фильтра в  $\text{мм}^2$ ,  $g$  – сумма объектов в общем с 20 полей,  $a$  – площадь поля зрения в микроскопе,  $m$  – объём воды в мл,  $z$  – количество полей зрения.

**Трансмиссионная электронная микроскопия** была применена для проверки наличия и определения размерного спектра вирусных частиц.

Нефиксированный вирусный концентрат наносили в объеме 20 мкл на медные сетки, покрытые углеродной подложкой, высушивали на воздухе и контрастировали 2% уранилацетатом. Препараты просматривали в трансмиссионный электронный микроскоп LEO-906E (Zeiss, Германия), напряжение 80 кВ, при увеличении 40000–100000×.

**Проточную цитометрию** использовали для учёта вирусных частиц и бактерий. Рабочий раствор красителя SYBR Green I готовили в разбавлении  $10^{-2}$  и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Конечное разбавление в пробе составляло  $10^{-4}$ . Окрашивание проводили в темноте в течение 40 мин., непосредственно перед измерениями (Brussaard, 2004; Marie et al., 1997).

Калибровку цитометрических измерений размеров клеток по каналу FS выполняли с помощью разноразмерных (0,2-10 мкм) флуоресцентных микросфер (Beckman Coulter, Molecular Probes, США).

Автотрофный пикопланктон, а именно, цианобактерии рода *Synechococcus* (Syn) и водоросли (PicoE) были выявлены по размерам клеток (менее 3 мкм) и их автофлуоресценции в красной и оранжевой областях спектра с последующей оценкой численности. Эти группы образовывали два характерных кластера клеток на цитограммах, первый из которых характеризовался высоким содержанием фикоэритрина (Syn), второй – его отсутствием (Pico-E).

Общую численность автотрофного пикопланктона (пикофитопланктон) определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (канал FS) и автофлуоресценции в красной (FL4, 675 нм) и оранжевой (FL2, 575 нм) областях спектра на безразмерных логарифмических шкалах.

Численность бактерий и вирусных частиц определяли в пробах, окрашенных SYBR Green I, с помощью гейтинга популяции клеток/частиц на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах.

Концентрацию клеток бактерио- и пикофитопланктона рассчитывали по скорости протока пробы (соответственно, 15 мкл и 60 мкл мин.<sup>-1</sup>), времени счёта (60-480 сек.) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток.

Обработку цитометрических данных выполняли, используя программное обеспечение Flowing Software v. 2.5.0 (Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Финляндия, [www.flowingsoftware.com](http://www.flowingsoftware.com)). Обработка проб произведена с помощью проточного цитометра Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США) на базе ФГБУН ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь).

#### **2.2.4 Секвенирование гена *g23* T4-подобных бактериофагов в биоплёнках методом Сенгера**

Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом. Для амплификации использовали праймеры MZIA1bis и MZIA6 (Filée et al., 2005). Реакционная смесь содержала следующие компоненты на один образец: 5 мкл 2 × ПЦР-Color HS-Taq (BioMaster, Россия), по 0,1 мкл (10 pmol) праймеров, 3,8 мкл mQ H<sub>2</sub>O. Реакцию проводили на приборе «Бис» (Россия) по следующей программе: 94°C – 5 мин, далее 35 циклов денатурация 94°C – 1 мин, отжиг праймеров 50°C – 1 мин, 72°C – 1 мин, этап завершающего синтеза – 72°C, 10 мин.

Ампликоны первоначально визуализировали электрофорезом в 6%-ном полиакриламидном геле в 1× TAE буфере с последующим окрашиванием в растворе бромистого этидия. Фрагменты ожидаемой молекулярной массы (300-700 п.н.) вырезали и использовали как источник ДНК в повторной амплификации объёмом 20 мкл. Далее проводили электрофорез в 0,8% агарозном геле. Полученные ампликоны клонировали, применяя набор Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование фрагментов гена *g23* произведено в компании «Синтол» (Москва, Россия).

Нуклеотидные последовательности фрагментов гена *g23* редактировали, транслировали с помощью программы BioEdit (v. 7.0.9) (Hall,

1999). Поиск ближайших соседей выполняли, используя BLAST-анализ (E-value threshold –  $1e^{-6}$ ), база данных – NR (v. 2018) («Basic Local Alignment Search Tool [Electronic resource], n.d. – URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>»). Выравнивание последовательностей проводили в программе Mega 7 (Kumar, Stecher, Tamura, 2016) с помощью алгоритма ClustalW с последующей проверкой в программе Gblocks (Castresana, 2000). Филогенетическое древо конструировали, применяя Байесовский анализ с помощью программы MrBayes (v. 3.2.6) (Huelsenbeck, Ronquist, 2001), модель аминокислотного замещения Blosum62. В программе запускали два независимых анализа МСМС, в течение 10 млн. генераций, параметр отжига 25% (отбрасывание начальных генераций), 4 цепи (одна холодная и три горячих). Численные эксперименты проводили на вычислительном кластере «Академик В.М. Матросов» (Irkutsk Supercomputer Center of SB RAS, <http://hpc.icc.ru>). Трассировочные файлы, сгенерированные в ходе МСМС, анализировали с помощью программы Tracer 1.6 (Rambaut и др., 2013).

На основе аминокислотных последовательностей получали матрицу дистанций метрикой UniFrac (unweighted, алгоритм выравнивания – ClustalW, модель – Blosum62), с последующим использованием иерархического кластерного анализа (hclust) (Murtagh, 1992), метод «average» (= UPGMA), применяя пакеты phyloseq (v. 1.21.0), phangorn (v. 2.2.0), реализованных в программе R (v. 3.2.4). Подбор эволюционной модели осуществляли в программе Mega 7.

### **2.2.5 Таргетное секвенирование фрагмента гена *g23* с использованием высокопроизводительного секвенирования**

Пробу воды не концентрировали и не выделяли ДНК. Основная масса вирусов семейства *Myoviridae* – это литические фаги (Suttle, 2005), поэтому большинство из них присутствует в воде в виде свободных вирусных частиц, а не внутри клеток бактерий. Капсид, в свою очередь, легко разрушается во время первого цикла денатурации ПЦР (Kawai, 1999). Пробу воды

пропускали через фильтрующую насадку 0,2 мкм (Sartorius, Германия). Фильтрат служил матрицей для ПЦР с праймерами MZIA1bis и MZIA6 (Filée et al., 2005).

ПЦР-реакция приготовлена, используя набор Amplisens (InterLabService, Россия); 9 мкл образца добавляли в 6 мкл ПЦР смеси, содержащей 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,20 mM концентрация каждого дНТФ; 20 pmol каждого праймера и 1 единицу Taq-полимеразы. Ампликоны первоначально визуализировали в 4% полиакриламидном геле, как описано выше. Полоски и кусочки геля ожидаемого размера (от 380 до 600 п.н. согласно (Filée et al., 2005)) вырезали из геля и использовали как ДНК матрицу для второй ПЦР. Все компоненты реакционной смеси и условия были такими же, как и в первой ПЦР.

ПЦР-продукты после разделения в 0,8% агарозном геле вырезали, затем очищали с помощью Wizard SV Gel PCR Clean-Up System (Promega, США) и далее объединяли в один образец.

Библиотеку готовили, используя NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit, (New England Biolabs, США), секвенирование выполняли с обоих концов (2×300) на платформе MiSeq (Illumina) (ЦКП «Геномика», г. Новосибирск), позволяющем получать ДНК-кластеры на проточном чипе (твердофазная ПЦР) и проводить их секвенирование.

Парные риды (PEs) фильтровали по качеству (QV>20). Химерные последовательности, праймеры и адаптеры удаляли. Все шаги произведены с использованием CLC GW 7.0 (CLC Bio). Для объединения парных прочтений применяли программу PandaSeq (Masella et al., 2012), минимальная длина перекрытия составила 20 нуклеотидов.

В работе применяли программное обеспечение QIIME (v. 1.9.1), используя скрипты *scripts pick\_otus.py* для кластеризации нуклеотидных последовательностей и *pick\_rep\_set.py* для назначения репрезентативных последовательностей из кластеров (Caporaso et al., 2010).

Основываясь на анализе кривых насыщения, выбран порог 97% (процент сходства последовательностей) для назначения ОТЕ на нуклеотидном уровне, такой же уровень ранее использован в работе по горячим источникам (Millard, Pearce, Zwirgmaier, 2016).

Репрезентативные нуклеотидные последовательности фрагмента гена *g23* транслировали в аминокислотные последовательности программой BioEdit (v. 7.0.5) (Hall, 1999).

Ближайшие родственники репрезентативных последовательностей определялись программой BLAST (BLAST Assembled RefSeq Genomes [Electronic resource]. – URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (e-value –  $10^{-6}$ ). Полученным ОТЕ был назначен персональный идентификатор BS OTU.

Для филогенетического анализа из базы данных GenBank выбирали репрезентативные *g23* аминокислотные последовательности из других пресноводных экосистем и из Чесапикского залива, используя программу CD-HIT (Huang et al., 2010). Порог сходства для кластеризации указывали 70% (средний процент сходства культивированных фагов из групп T-evens, Pseudo T-evens, Schizo T-evens, Exo T-evens (Desplats et al., 2001; Hambly et al., 2001).

Выравнивание репрезентативных BS OTU последовательностей проводили в программе Mega 7 (Kumar, Stecher, Tamura, 2016), используя алгоритм ClustalW. Филогенетическое дерево конструировали, применяя Байесовский анализ с помощью программы MrBayes (v. 3.2.6) (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). В программе запускали два независимых анализа МСМС, в течение 20 млн. генераций, параметр отжига 25% (отбрасывание начальных генераций), 4 цепи (одна холодная и три горячих). Трассировочные файлы, сгенерированные в ходе МСМС, анализировали с помощью программы Tracer (v. 1.6) (Rambaut et al., 2013).

Для анализа альфа-разнообразия применяли программу DnaSP v.6 (Rozas et al., 2017). Для сравнения бета-разнообразия сообществ бактериофагов в образцах применяли невзвешенную (качественную) метрику

UniFrac, далее проводили координационный анализ (PCA), применяли пакеты phyloseq (v. 1.21.0), phangorn (v. 2.2.0), vegan (v. 2.4-3), реализуемые в программе R (v. 3.2.4).

Необработанные данные, полученные в результате секвенирования, депонированы в архив SRA (NCBI) под номером SRR5469168.

### **2.2.6 Метагеномное секвенирование вирусного сообщества в оз.**

#### **Байкал (виром)**

Пробы фильтровали через поликарбонатные фильтры с диаметром пор 0,4 мкм (Millipore, США) для удаления фито- и зоопланктона. Фильтраты концентрировали с помощью системы ультрафильтрации в тангенциальном потоке VivaFlow 200 (Sartorius, Германия) до конечного объема ~20 мл. Далее образцы пропускали через насадку с диаметром пор 0,2 мкм (Sartorius, Германия) для удаления бактерий и в последующем концентрировали с помощью Vivaspin Turbo 15 (Sartorius, Германия), (50 кДа) до объема ~100 мкл.

Для получения свободных вирусных частиц проводили обработку пробы ДНКазой (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C в течение 30 мин. ДНКазу деактивировали добавлением 20 мкл EDTA 50 mM при 65°C и выдерживали 10 минут (Thurber et al., 2009). Наличие ДНК бактерий проверяли методом ПЦР, используя универсальные бактериальные праймеры 27L (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') и 1542R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCS-3') (Brosius et al., 1981). Анализ на агарозном геле показал отсутствие полос.

ДНК выделяли стандартным фенол-хлороформным методом. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя (получено ~50 нг ДНК). Выделенную ДНК замораживали при -80°C и в замороженном виде доставляли в ЦКП «Геномика» (г. Новосибирск, Россия).

ДНК фрагментировали на Covaris S2 (USA) и готовили библиотеки с помощью набора реагентов NEBNext Ultra II (New England Biolabs, США). Полученные ДНК-библиотеки секвенировали по технологии Illumina (США) на приборе Miseq (США) с использованием реактивов Kit v3 2x300 (Illumina, США).

Первоначальный контроль качества проводили, используя программу Fast QC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), затем полученные данные обрабатывали с помощью Trimmomatic v. 0.36 (Bolger, Lohse, Usadel, 2014), применяя параметр SLIDINGWINDOW:4:20, последовательности короче 50 нуклеотидов удаляли из анализа.

Виромы анализировали, используя онлайн систему Meta Genome Rapid Annotation using Subsystem (MG-RAST) (Meyer et al., 2008).

Для сборки *de novo* применяли метагеномный «сборщик» SPAdes 3.13.0 (С.-Петербург, Россия), metaspades, с параметрами по умолчанию (Bankevich et al., 2012). Из контигов, собранных SPAdes с помощью программы VIBRANT (1.2.0) (Kieft, Zhou, Anantharaman, 2019), отсортировывали контиги, принадлежащие вирусам, в процессе обработки удаляли контиги короче 5 т.п.н. Далее контиги аннотировали с помощью blastn (DB RefSeq 2019 и GenBank 2019), (e-value параметр –  $10^{-3}$ ). Для предсказания генов применяли программу MetaGeneMark (Zhu, Lomsadze, Borodovsky, 2010) затем осуществляли поиск по базе данных NR NCBI вручную с использованием blastp. Сходство между контигами и референсными геномами визуализировали с помощью EasyFig (Sullivan, Petty, Beatson, 2011). Для проверки степени покрытия байкальских контигов ридами (reads) применяли программы BWA (алгоритм MEM, Li H., не опубликован) и Samtools (Li et al., 2009). Результат визуализировали в геномном браузере IGV (Robinson et al., 2011).

Сравнительный анализ виромов проводили, применяя программы Centrifuge (v. 1.0.4) (Kim et al., 2016), R (v.3.6.1), пакет vegan (v 2.5-6) и скрипт на python3 (Ivanov, 2019). Дендрограмма получена на основе

сравнения байкальских виромов с 22 виromaми из различных источников: залив, океан (Gong et al., 2018), море (Garin-fernandez et al., 2018), река (неопубликованные данные), озёра (Butina et al., 2019b; Mohiuddin, Schellhorn, 2015; Okazaki et al., 2019; Skvortsov et al., 2016; Watkins et al., 2015), почва (Trubl et al., 2018; Yu, Han, 2018), гидротермальный источник (Nakai et al., 2011). Сравнительный анализ выполняли при следующих параметрах: нормализация – normalize, измерение расстояний – Bray, затем на основе матрицы расстояний строили дерево методом UPGMA (кластерный алгоритм – Average) .

Ординационную диаграмму виромов по гидрохимическим, гидрофизическим показателям мест отбора проб и таксономии строили методом NMDS (пакет *vegan*, версия 2.5-6).

Индексы разнообразия по Шеннону рассчитывали на основе k-меров равные 3, 4, 5, применяя пакеты *vegan* (v. 2.4-3) и *k-mers* (v. 1.1.2), входными данными служили контиги, отсортированные VIBRANT, длиной более 5000 нк.

Необработанные данные были загружены на сервер MG-RAST, под номерами BVP1 – mgm4814173.3 (подлёдное сообщество), BVP2 – mgm4816981.3, BVP3 – mgm4821571.3, BVP4 – mgm4816982.3 (поздневесенние сообщества), и в архив NCBI SRA project – PRJNA547700 (архив содержит BVP1 и BVP2). Образцы BVP5 и BVP6 на момент написания диссертации имеют статус приватных данных.

Статистическая обработка результатов проведена при помощи программы R-Studio 3.6.3 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.6.3/>).

## ГЛАВА 3. ЧИСЛЕННОСТЬ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ И БАКТЕРИЙ В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ

### 3.1 Оценка численности бактерий и вирусных частиц методами проточной цитометрии и эпифлуоресцентной микроскопии

Численность свободных вирусных частиц и бактерий определяли в сентябре 2012 г. на трех станциях в пелагиали южной котловины оз. Байкал, используя методы проточной цитометрии и эпифлуоресцентной микроскопии, согласно методикам описанным ранее (Brussaard et al., 2010; Noble, Fuhrman, 1998; Porter, Feig, 1980).

Показатели численности бактерий, пикоцианобактерий и вирусных частиц в слое 0-50 м на центральных станциях трех разрезов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Численность вирусных частиц, ПЦБ и гетеротрофных бактерий, полученная методами ПЦ и ЭФМ (слой 0-50 м)

Станция	ПЦ			ЭФМ		
	ВЧ*, частиц/мл $\times 10^6$	ПЦБ**, кл/мл $\times 10^5$	Гетеротроф. бактерии, кл/мл $\times 10^6$	ВЧ, частиц/мл $\times 10^6$	ПЦБ, кл/мл $\times 10^5$	Гетеротроф. бактерии, кл/мл $\times 10^6$
пос. Маритуй – пос. Солзан	5 $\pm$ 0,9	2 $\pm$ 0,7	2,5 $\pm$ 0,5	3,8 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 1,2	2,3 $\pm$ 0,6
пос. Листвянка – пос. Танхой	4,3 $\pm$ 0,7	1,7 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,4	4,1 $\pm$ 0,7	2,4 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,5
м. Кадильный – пос. Мишиха	3,5 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,5	3,5 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,5

\* ВЧ – вирусные частицы

\*\* ПЦБ - пикоцианобактерии

Примечание. После знака « $\pm$ » приводится величина стандартной ошибки среднего.

На центральной станции разреза пос. Маритуй – пос. Солзан в слое 0-50 м численность вирусных частиц (ВЧ) составила  $5\pm 0,9 \times 10^6$  частиц/мл по данным ПЦ и  $3,8\pm 0,3 \times 10^6$  частиц/мл по результатам ЭФМ, численность

бактерий –  $2,5 \pm 0,5 \times 10^6$  кл/мл (ПЦ),  $2,3 \pm 0,6 \times 10^6$  кл/мл (ЭФМ), пикоцианобактерий  $2 \pm 0,7 \times 10^5$  (ПЦ),  $3,5 \pm 1,2 \times 10^5$  (ЭФМ).

На центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой в слое 0-50 м численность ВЧ составила  $4,3 \pm 0,7 \times 10^6$  частиц/мл по данным ПЦ и  $4,1 \pm 0,7 \times 10^6$  частиц/мл по результатам ЭФМ, численность бактерий –  $2,3 \pm 0,4 \times 10^6$  кл/мл (ПЦ),  $2,5 \pm 0,5 \times 10^6$  кл/мл (ЭФМ), пикоцианобактерий  $1,7 \pm 0,5 \times 10^5$  кл/мл (ПЦ),  $2,4 \pm 0,6 \times 10^5$  (ЭФМ).

На центральной станции разреза м. Кадильный – пос. Мишиха в слое 0-50 м численность ВЧ варьировала по данным двух методов в диапазоне от 1,1 до  $4,7 \times 10^6$  частиц/мл (ПЦ) и от 0,2 до  $4,5 \times 10^6$  частиц/мл (ЭФМ), бактерий от 0,5 до  $3,6 \times 10^6$  кл/мл (ПЦ), от 0,6 до  $4,3 \times 10^6$  кл/мл (ЭФМ), пикоцианобактерий от  $0,03$  до  $4,9 \times 10^5$  кл/мл (ПЦ) и от 0,07 до  $6,1 \times 10^5$  кл/мл (ЭФМ).

Результаты оценки численности бактерий, вирусных частиц (ВЧ) и пикоцианобактерий, полученные двумя методами, показали высокую значимую корреляционную связь (коэффициент корреляции Пирсона, ККП;  $r = 0,83-0,99$ ,  $p < 0,05$ ). Метод проточной цитометрии, использованный в данной работе, впервые применен для учёта вирусов и бактерий в озере Байкал (Потапов и др., 2013).

В сравнительном аспекте можно отметить, что данные по численности ВЧ в оз. Байкал сходны с результатами, полученными в олиготрофных озерах: Госсенколле (Австрия) – до  $4,6 \times 10^6$  частиц/мл (Hofer, Sommaruga, 2001), Верхнее (Канада, США) –  $0,32 \times 10^6$  частиц/мл (Tapper, Hicks, 1998), в ультраолиготрофном озере Спрот (Канада) –  $1,5-2 \times 10^6$  частиц/мл (Klut, Stockner, 1990). Известно, что количество вирусов зависит от степени трофности озера, т.к. численность вирусов имеет положительную связь с численностью своих хозяев – бактерий, а численность бактерий, в свою очередь, выше в более продуктивных водоёмах (Bettarel et al., 2003; Bettarel et al., 2004; Wommack, Colwell, 2000).

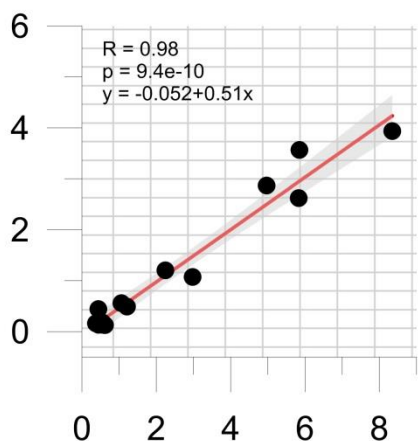
Полученные показатели численности пикоцианобактерий – основного компонента автотрофного пикопланктона – сопоставимы с ранее

опубликованными (Belykh, Sorokovikova, 2003; Belykh et al., 2006). В случае гетеротрофных бактерий следует отметить, что большей частью, сведения об общей численности бактериопланктона в оз. Байкал приводятся для весеннего периода, который характеризуется максимальной сезонной продуктивностью фитопланктона (Butina et al., 2010; Straškrábová et al., 2005). Многолетние регулярные наблюдения ОЧБ получены с использованием метода световой микроскопии и окраски эритрозином (Максимова, Максимов, 1989), который дает более низкие значения, чем при применении флуоресцентной микроскопии и специфического окрашивания флуоресцентными красителями (Porter, Feig, 1980). В сентябре численность гетеротрофных бактерий достаточно высокая как по нашим, так и по литературным сведениям. Так, согласно результатам, полученным с применением DAPI, ОЧБ в сентябре в Ю. Байкале в верхнем 0-10 м слое достигала 2 млн. кл/мл (Максимов, Щетинина, 2009).

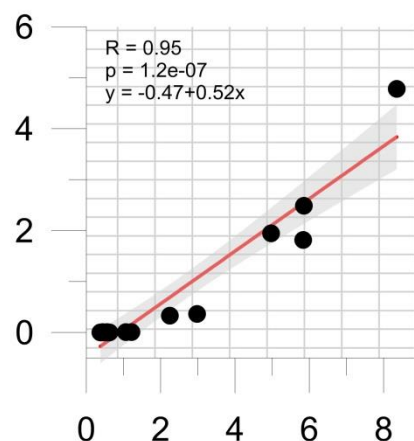
Известно, что увеличению численности бактериопланктона способствует повышение содержания растворенного органического вещества, продуцируемого фитопланктоном (Azam, Graf, 1983; Weisse et al., 1990). В осенний период в оз. Байкал, как известно, наблюдаются низкие количественные показатели сетного фитопланктона (Popovskaya, 2000), однако численность фотоавтотрофных пикопланктонных цианобактерий остается высокой как и концентрация бактериопланктона.

Регрессионный анализ выявил положительные корреляции между численностью ВЧ и гетеротрофных бактерий ( $r = 0,93-0,98$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ), а также ВЧ и ПЦБ ( $r = 0,80-0,95$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ). Данные показывают бóльшую зависимость количества ВЧ от численности гетеротрофных бактерий, чем ВЧ от численности ПЦБ (рис. 5).

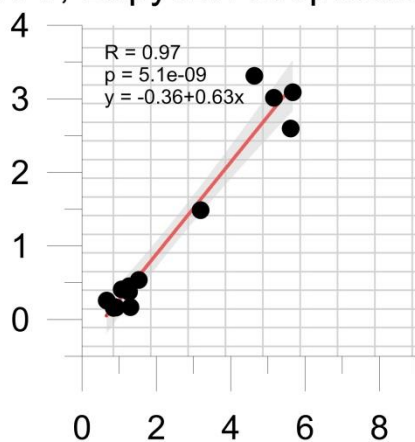
М-С, Вирусы/Гетер.бакт.



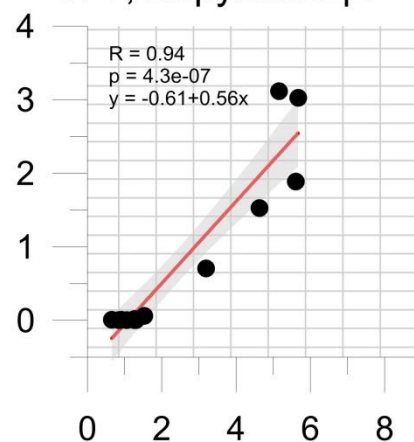
М-С, Вирусы/ПЦБ



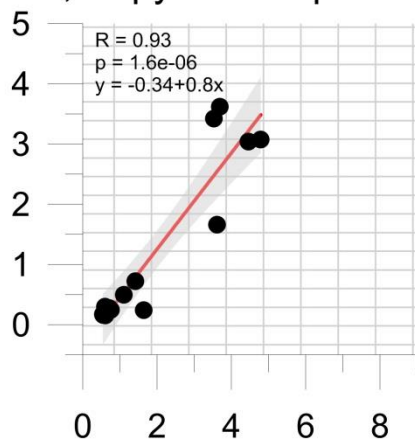
Л-Т, Вирусы/Гетер.бакт.



Л-Т, Вирусы/ПЦБ



К-М, Вирусы/Гетер.бакт.



К-М, Вирусы/ПЦБ

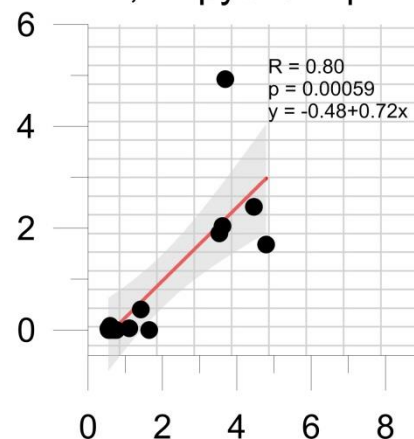


Рисунок 5 – Регрессионный анализ вирусы/гетеротрофные бактерии и вирусы/ПЦБ, метод ПЦ. М-С – ц. ст. пос. Маритуй – пос. Солзан, Л-Т – ц. ст. пос. Листвянка – пос. Танхой, К-М – ц. ст. м. Кадильный – пос. Мишиха

Высокую положительную корреляционную связь между количеством ВЧ и гетеротрофных бактерий также наблюдали в олигомезотрофном озере

Павин, Франция (Bettarel et al., 2003), подобная взаимосвязь выявлена и в других исследованиях пресноводных (Hennes, Simon, 1995; Tuomi, Torsvik, Heldal, 1997) и морских (Alonso et al., 2001) экосистем. Вирусы, как известно, являются важным фактором регуляции численности и структуры микробных сообществ, поражая автотрофные и гетеротрофные бактерии – основной компонент планктона морских и пресных экосистем (Kutter, Sulakvelidze, 2005).

Трофический статус озера Байкал по данным многолетних гидрохимических наблюдений (Khodzher et al., 2017), является олиготрофным, не смотря на значительные негативные изменения в экосистеме озера в 2013-2019 гг. (Timoshkin et al., 2016). Наши результаты подтверждают олиготрофный статус озера, основываясь на результатах определения хлорофилла *a* и прозрачности воды. Концентрация хлорофилла *a* на 3-х станциях в сентябре достигала  $1,9 \pm 1,7$  мкг/л (табл. 2). Прозрачность воды по диску Секки составляла 7-8 м, что, согласно Р. Волленвейдеру (Vollenweider, Kerekes, 1982), соответствует олиготрофному статусу.

Для молекулярно-генетических исследований проведена оценка вирусной фракции на наличие других гидробионтов, клеточного дебриса и т.д. с помощью ТЭМ. При ТЭМ-наблюдении обнаружено несколько морфологических типов свободных вирусных частиц. Большинство вирусов представлены хвостатыми бактериофагами, среди них доминировали представители семейства *Myoviridae*. Размеры фаговых частиц варьировали: капсиды – 76-126 нм, хвосты – 25-619 нм. Все бактериофаги имели полиэдральную форму головки (рис. 6).

Таблица 2 – Температура, концентрация хлорофилла *a* и содержание кислорода на различных глубинах оз. Байкал (сентябрь, 2012 г.)

Глубина, м	Маритуй–Солзан			Листвянка–Танхой			Кадильный–Мишиха		
	Т, °С	Кислород, мг/л	Хлорофилл <i>a</i> , кг/л	Т, °С	Кислород, мг/л	Хлорофилл <i>a</i> , мкг/л	Т, °С	Кислород, мг/л	Хлорофилл <i>a</i> , мкг/л
0	11,69	10,73	1,51	11,30	10,37	1,66	9,64	10,73	1,79
5	11,19	10,92	1,38	10,50	10,44	2,71	9,29	10,92	2,16
10	4,83	11,31	3,42	8,35	11,06	3,3	7,25	11,31	2,27
15	4,36	11,09	3,39	7,11	11,11	–	6,26	11,09	2,52
25	4,05	11,31	1,66	5,28	11,14	1,7	5,46	11,31	1,22
50	3,90	11,40	0,75	3,93	11,35	0,78	3,93	11,40	0,30
100	3,80	11,38		3,83	11,37		3,80	11,38	
150	3,69	11,35		3,73	11,34		3,69	11,35	
200	3,64	11,27		3,66	11,31		3,62	11,27	
400	3,48	10,80		3,47	10,89		3,45	10,80	
600	3,40	10,36		3,39	10,37		3,40	10,36	
800	3,38	10,23		3,38	10,23		3,38	10,23	
1000	3,36	10,08		3,36	10,13		3,36	10,08	
1200	3,35	10,01		3,35	10,04		3,35	10,01	

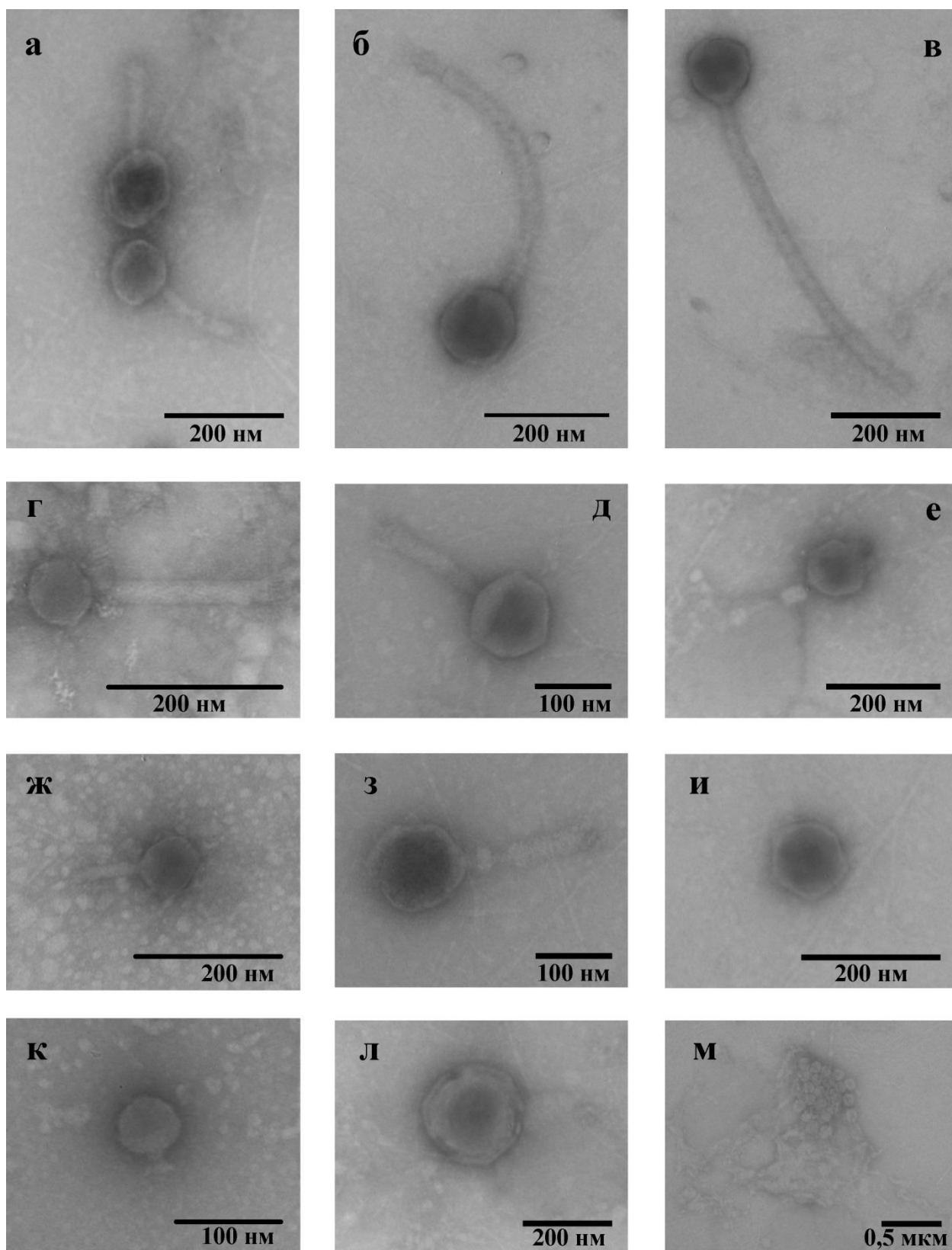


Рисунок 6 – Морфология вирусов озера Байкал по данным ТЭМ: а, г, д, е, ж, з – вирусы семейства *Myoviridae*; б, в – *Siphoviridae*; к – *Podoviridae*; и, л – вирусные частицы без хвостового отростка; м – лизированная клетка

### **3.2 Оценка вертикального распределения вирусных частиц, бактерий, пикоцианобактерий в разные периоды термальной стратификации**

Вертикальные профили численности вирусных частиц, бактерий, пикоцианобактерий исследованы в периоды положительной стратификации вод и весеннего перемешивания.

В условиях гомотермии (диапазон изменения температуры воды +3,2-3,5°C) в июне 2015 г. вертикальное распределение исследуемых показателей на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой было неравномерным (рис. 7). Наиболее высокая численность бактерий с максимумом  $0,75 \times 10^6$  кл/мл на глубине 5 м и вириопланктона с пиком  $2,5 \times 10^6$  частиц/мл на глубине 15 м отмечена в верхнем 50-метровом слое, соотношение численности вирусов к численности бактерий (VBR, virus to bacteria ratio) достигало 20 (на 15 м). В более глубоких слоях, ниже 50 м, количество вирусных частиц и бактерий уменьшалось до минимальных показателей:  $0,07 \times 10^6$  частиц/мл (1000 м) и  $0,003 \times 10^6$  кл/мл (1200 м), соответственно, при этом их соотношение составило в среднем 10. Максимальное значение VBR выявлено на глубине 1200 м и составило 44.

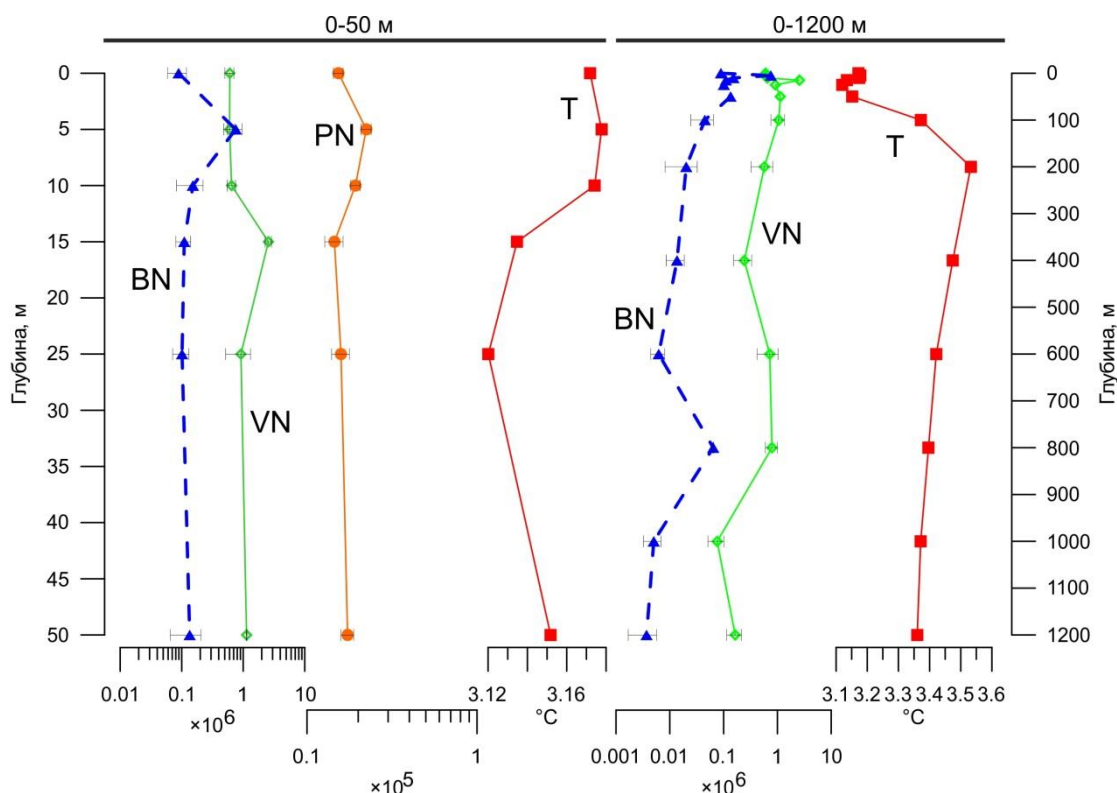


Рисунок 7 – Профили вертикального распределения компонентов вирусной «петли», на глубоководной станции в южной части оз. Байкал (июнь 2015 г.). BN – численность бактерий (кл/мл), VN – численность вириопланктона (частиц/мл), PN – численность пикоцианобактерий (кл/мл), T – температура

В период положительной стратификации в августе 2015 г. температура поверхности достигала 17,7-18°C, снижаясь до 3,2°C на глубине 20 м (рис. 8). Среднее значение градиента было равным 0,6°C на метр. По литературным данным летом при  $T > 3,96^\circ\text{C}$  конвекция прекращается, формируется неглубокий (до 5-10 м) прогретый эпилимнион с залегающим под ним термоклином (Троицкая, Шимараев, 2005). В эпилимнионе наибольшую численность вирусов наблюдали на поверхности и глубине 15 м, VBR в слое 0-50 м достигало 11,8. В гиполимнионе численность вирусов и бактерий резко снижалась до  $0,47 \pm 0,1 \times 10^6$  частиц/мл и  $0,04 \pm 0,01 \times 10^6$  кл/мл, соответственно, значения VBR варьировали по горизонтам, пик (21) найден на глубине 800 м.

Увеличение VBR на больших глубинах в водах оз. Байкал согласуется с похожими наблюдениями в глубоководной зоне Атлантического океана ( $VBR > 100$ ) (Parada et al., 2007), однако достоверных объяснений пока не имеет (Suttle, 2007).

Полученные в данной работе профили вертикального распределения численности вирусов, гетеротрофного бактериопланктона и ПЦБ оз. Байкал сопоставимы с описанными ранее другими авторами (Белькова и др., 2003; Дрюккер, Дутова, 2009; Belykh, Sorokovikova, 2003; Katano et al., 2008).

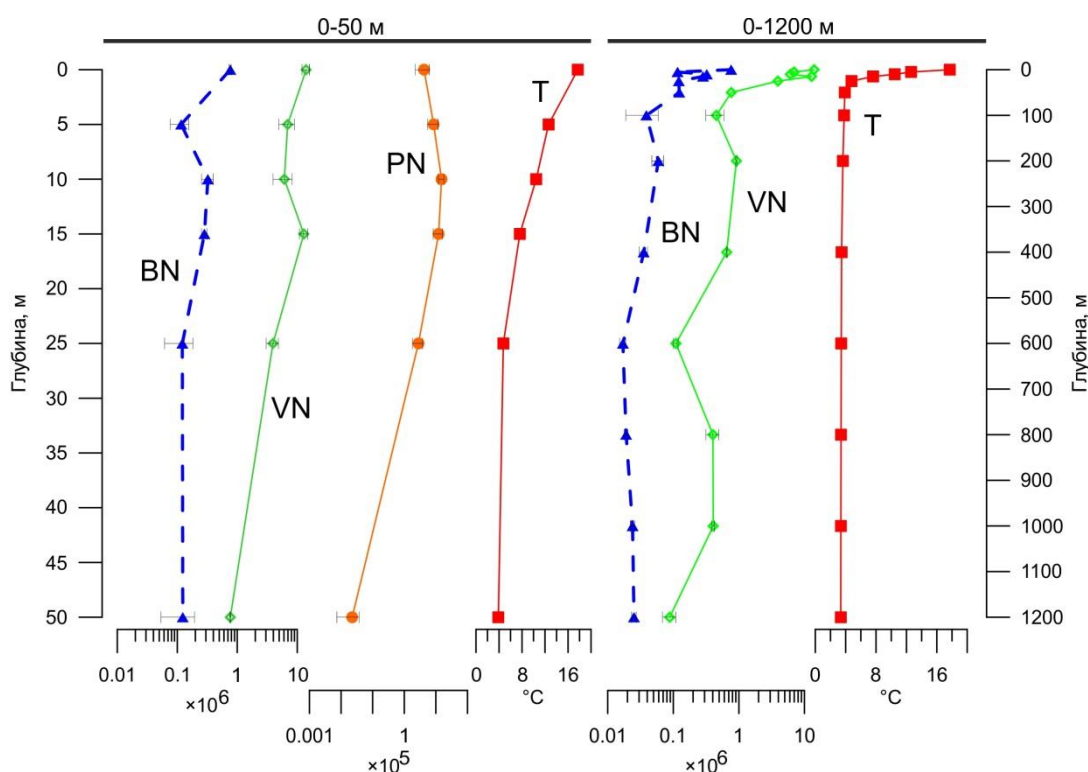


Рисунок 8 – Профили вертикального распределения компонентов вирусной «петли», на глубоководной станции в южной части оз. Байкал (август 2015 г.). BN – численность бактерий (кл/мл), VN – численность вириопланктона (частиц/мл), PN – численность пикоцианобактерий (кл/мл), T – температура

Осенью, в период понижения температуры в верхнем слое воды, наибольшую численность бактерио- и вириопланктона в пелагиали южной котловины оз. Байкал отмечали в эпилимнионе, наименьшую – в гиполимнионе. Так, на центральной станции разреза пос. Маритуй – пос.

Солзан ВЧ были наиболее многочисленными на глубине 15 м ( $8,3 \times 10^6$  частиц/мл), наименее – на глубине ниже 800 метров (до  $0,4 \times 10^6$  частиц/мл). Максимальная концентрация ПЦБ, обнаруженная на глубине 15 м, составляла  $4,8 \times 10^5$  кл/мл (ПЦ),  $8,1 \times 10^5$  кл/мл (ЭФМ). Пик численности гетеротрофных бактерий на глубине 15 м достигал  $3,9 \times 10^6$  кл/мл (ПЦ) и  $3,3 \times 10^6$  кл/мл (ЭФМ).

На центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой максимум численности ВЧ зарегистрирован на глубине 10 метров –  $5,6 \times 10^6$  частиц/мл (ПЦ),  $4,9 \times 10^6$  частиц/мл (ЭФМ); наибольшее количество ПЦБ найдено на 15 метрах – до  $3,1 \times 10^5$  кл/мл (ПЦ),  $3,5 \times 10^5$  кл/мл (ЭФМ); гетеротрофные бактерии в массе присутствовали в поверхностных слоях воды (0 м) – до  $3,3 \times 10^6$  кл/мл (ПЦ),  $3,5 \times 10^6$  кл/мл (ЭФМ).

На центральной станции разреза м. Кадильный – пос. Мишиха пик численности ВЧ обнаружен на глубине 5 м. Наибольшее количество ПЦБ отмечено на глубине 15 м –  $4,9 \times 10^5$  кл/мл (ПЦ) и  $6,1 \times 10^5$  кл/мл (ЭФМ), как и гетеротрофных бактерий –  $3,6 \times 10^6$  кл/мл (ПЦ) и  $4,3 \times 10^6$  кл/мл (ЭФМ). Соотношение VBR на трёх станциях в слое 0-50 варьировало от 1 до 2,8, в гипolimнионе этот показатель доходил до 7,8.

В целом численность вирусных частиц в эпилимнионе во все сезоны выше, чем в гипolimнионе. VBR было наибольшим в гипolimнионе, с максимальными значениями на глубинах ниже 600 м.

В летний и осенний сезоны наблюдали значимую корреляционную связь между численностью вирусов и бактерий (ККП,  $r = 0,9$ ,  $p < 0,05$ ) и между численностью вирусов и температурой воды (ККП,  $r = 0,8$ ,  $p < 0,05$ ). Исключение составил период обратной стратификации, во время которого не выявлено значимой корреляционной связи между численностью вирусов, температурой воды и численностью бактерий.

### 3.3 Сезонная динамика численности вирусных частиц и бактерий, метод ЭФМ

Сезонная динамика численности вирусных частиц, гетеротрофных бактерий и ПЦБ определена на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой в июне и сентябре 2015 и 2016 гг. с использованием ЭФМ, расчёт произведён для слоя 0-25 м (рис. 9).

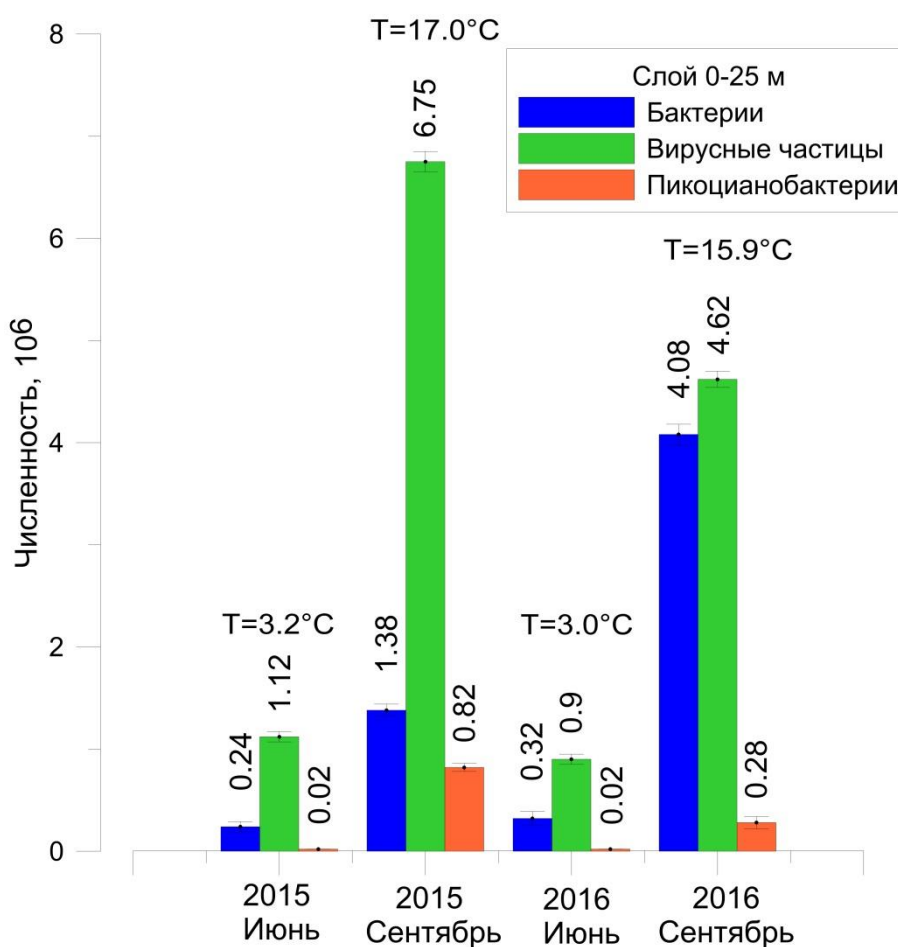


Рисунок 9 – Сезонная динамика численности бактерий, пикопланктонных цианобактерий и вирусных частиц на станции середина разреза пос.

Листвянка – пос. Танхой в слое 0-25 м в 2015 и 2016 гг. Т – температура поверхности воды (0 м)

За два года наблюдений выявлено, что численность ПЦБ и ОЧБ в июне значительно ниже, чем в сентябре, при этом она почти не различалась по годам, составляя в среднем  $0,02 \times 10^6$  кл/мл и  $0,24-0,32 \times 10^6$  кл/мл,

соответственно. В сентябре наблюдали увеличение численности бактерий: ПЦБ в 3 раза, ОЧБ в 13 раз. Максимальная концентрация вирусных частиц отмечена осенью 2015 г. ( $6,75 \times 10^6$  частиц/мл) – в период сезонного пика развития ПЦБ и в год высокоурожайный по пикопланктону. В сентябре 2016 г. количество ВЧ составило  $4,62 \times 10^6$  частиц/мл. Минимальная численность ВЧ выявлена в июне, при этом самое низкое количество ВЧ обнаружено в 2016 г. –  $0,9 \times 10^6$  частиц/мл. Величина VBR в слое 0-25 м достигала 20, что входит в диапазон значений, найденных в других пресных водоемах (Bettarel et al., 2003; Hofer, Sommaruga, 2001).

Выявленная зависимость между ростом численности пикоцианобактерий и повышением количества вирусных частиц свидетельствует о том, что в сентябре в вирусном сообществе увеличилась доля цианофагов – вирусов, поражающих цианобактерии. Увеличение количества вирусов неоднократно наблюдали при массовом развитии цианобактерий, в том числе и токсичных (Laybourn-Parry, Hofer, Sommaruga, 2001; Yoshida et al., 2008).

### **3.4 Межгодовая динамика численности вирусных частиц и бактерий, метод ЭФМ**

С 2011 по 2016 г. проводили ежегодную количественную оценку ОЧБ, ВЧ и ПЦБ на центральной станции разреза пос. Листвянка – пос. Танхой. Динамика численности ВЧ и бактерий приведена на рисунке 10. Слой 0-25 м взят как наиболее показательный, т.к. он составляет «трофогенный» слой водоёма. Именно здесь происходит максимальная продукция органического вещества фотоавтотрофными организмами. Анализируя полученные данные, можно отметить тренды увеличения численности ключевых компонентов «микробной» петли: гетеротрофных бактерий, пикоцианобактерий и вирусных частиц в исследуемые годы.

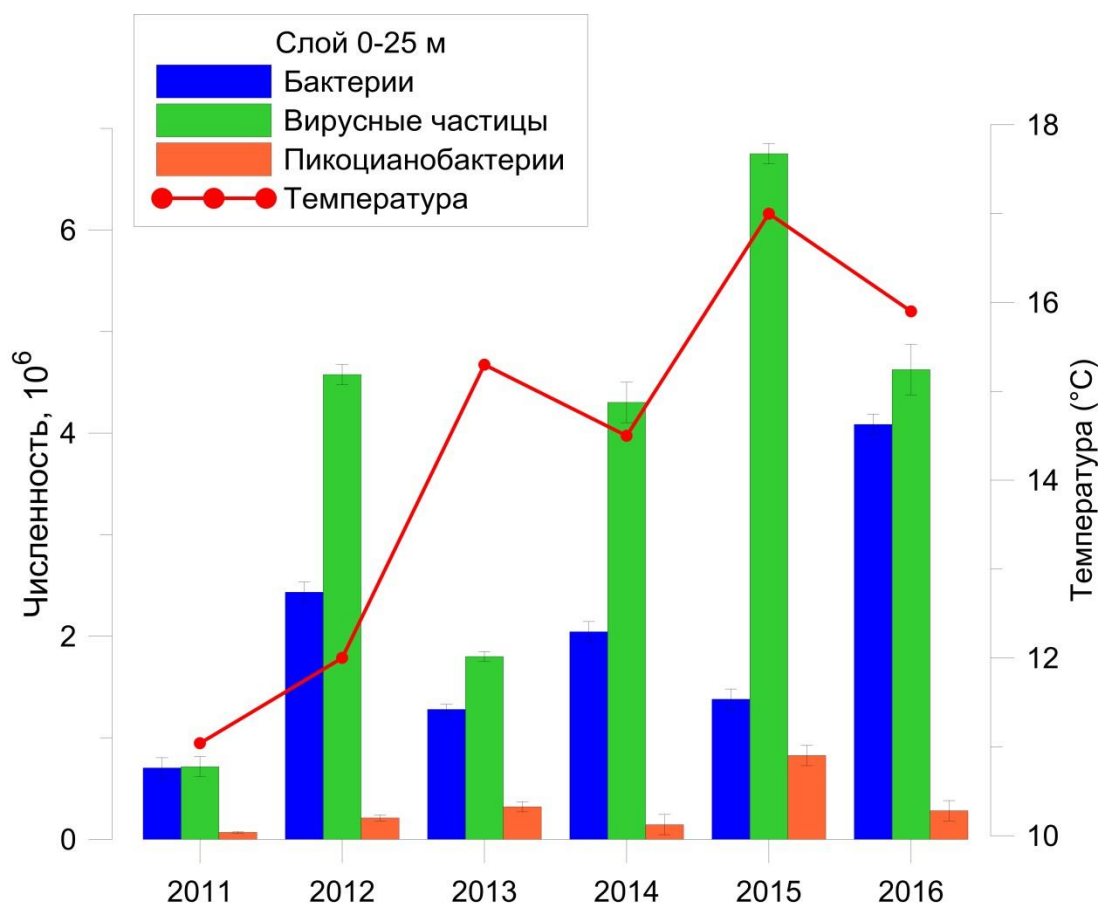


Рисунок 10 – Межгодовая динамика численности вирусных частиц, пикопланктонных цианобактерий и гетеротрофных бактерий на станции пос. Листвянка – пос. Танхой в слое 0-25 м в сентябре 2011-2016 гг. оз. Байкал

Корреляционный анализ обнаружил зависимость численности исследуемых компонентов планктона от температуры воды ( $r = 0,50-0,75$ ) с уровнем значимости  $p < 0,05$ . Как уже указывали, наибольшее количество ВЧ в осенний период выявлено в 2015 г., самое низкое – в 2011 г.

За период исследований установлена положительная корреляция между численностью вирусов и гетеротрофных бактерий ( $r = 0,92-0,97$ ,  $p < 0,05$ ), вирусов и пикоцианобактерий ( $r = 0,79-0,95$ ,  $p < 0,05$ ). В межгодовом аспекте результаты показали бóльшую зависимость количества вирусов от численности гетеротрофных бактерий, чем вирусов от пикоцианобактерий.

За весь период наблюдений установлено преобладание численности вирусных частиц над гетеротрофными бактериями и ПЦБ.

## ГЛАВА 4. АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ G23-СООБЩЕСТВ БАКТЕРИОФАГОВ В БИОПЛЁНКАХ ОЗ. БАЙКАЛ

Микроскопическое исследование биоплёнок, сформированных на поверхности камней в урезовой зоне на глубине 1 м около пос. Листвянка, выявило, что в них доминировали зелёные и харофитовые водоросли. В биоплёнках бордово-фиолетового цвета, отобранных с камней в районе пос. Большие Коты (2а), в районе м. Толстый (1D3Тр, 2D1) с глубин 6 м, 9 м, 36 м, соответственно, преобладали нитчатые цианобактерии порядка Oscillatoriales: *Symplocastrum* sp., *Tychonema* sp. и порядка Nostocales – *Tolypothrix* sp. На поверхности губок *Rezinkovia* sp. (2D 4-1) и *Swartschewskia papyracea* (2D 2-1) обнаружены диатомовые водоросли, нитчатые цианобактерии не найдены. В теле губок присутствовали зеленые водоросли, принадлежащие к классу *Trebouxiophyceae*, и коккоидные цианобактерии родов *Synechococcus* и *Cyanobium* (рис. 11). Метаданные образцов представлены в таблице 3.

Из проб биоплёнок получено 85 уникальных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *g23*: 37 из губок, 10 из биоплёнок, образованных на камнях в урезовой зоне, 25 из цианобактериальных обрастаний камней и 13 из поверхностного микрослоя воды. Длина нуклеотидных последовательностей варьировала от 342 до 459 п.н. (без учёта праймеров). Последовательности *g23* депонированы в базу данных GenBank под номерами: MH576490-MH576574.

Нуклеотидные последовательности имели некультивированных ближайших родственников: из водной толщи оз. Байкал (Butina et al., 2010), оз. Бурже и Анси (Франция) (Zhong, Jacquet, 2014), оз. Восточное (Китай) (Huang, Cheng, Xu, 2011), криоконитовых отверстий (архипелаг Шпицберген) и ледникового озера (Bellas, Anesio, 2013), рисовых полей Японии (Jia et al., 2007; Wang et al., 2009b) и Китая (Zheng et al., 2013), сточных вод (Ирландия)

(Кнарйк, Prentice, 2012) и осадков эстуария р. Жемчужной (Китай) (He et al., 2017).

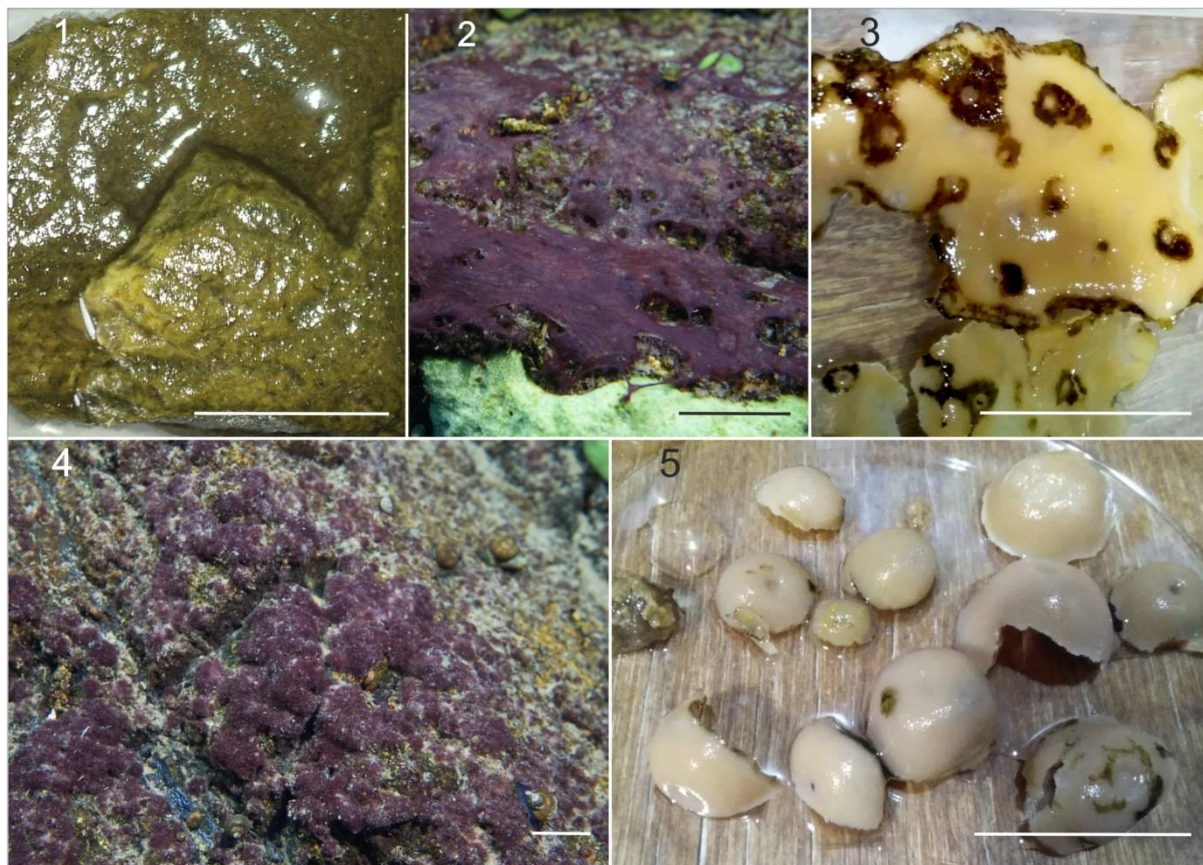


Рисунок 11 – Общий вид биопленок и субстратов: 1 – зелёные водоросли на каменном субстрате (LS), 2 – обрастания, сформированные цианобактерией *Tychonema* sp. на каменном субстрате (2D1), 3 – эндемичная губка *Rezinkovia* sp. (2D 4-1), 4 – кустистые дерновинки *Tolypothrix* sp. на каменном субстрате (1D3Тр), 5 – эндемичная губка *Swartschewskia papyracea* (2D 2-1). Шкала – 3 см

Из культивируемых фагов наибольшее сходство (77% на аминокислотном уровне) было с изолятом *Synechococcus* фаг S-CAM1 (YP\_007673099), выделенным на штамме *Synechococcus* sp. WH7803 (Тихий океан) (Henn et al., 2013). Наибольшее количество последовательностей на нуклеотидном уровне имело сходство с последовательностями из оз. Байкал (38,8%), 25,8% с последовательностями из озер Бурже и Анси, 12,9% с последовательностями из оз. Восточное, с остальными – 22,5% (каждый

менее 5,8%). Сходство последовательностей с ближайшими соседями из базы данных NCBI (на нуклеотидном уровне) варьировало от 70% до 99,7%.

Сходство на нуклеотидном уровне байкальских последовательностей из биоплёнок и планктона, полученных ранее, изменялось от 68 до 99%.

Таблица 3 – Метаданные образцов

Образец	Место отбора	Имя сообщества	Субстрат	Глубина, м	Количество g23 послед.	Доминирующие водоросли/бактерии в сообществе
LS	2, около пос. Листвянка	GreenStone	Камень	1	10	Нитчатые, зелёные
1D3Tp	1, м. Толстый	CyaStone	Камень	9	6	<i>Tolypothrix</i> sp.
2a	3, около пос. Б.Коты		Камень	6	13	<i>Symplocastrum</i> sp.
2D1	1, м. Толстый		Камень	36	6	<i>Tychonema</i> sp.
2D 4-1	1, м. Толстый	Sponges	Губка ( <i>Rezinkovia</i> sp.)	20	27	Диатомовые, <i>Trebouxiophyceae</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Cyanobium</i>
2D 2-1	1, м. Толстый		Губка ( <i>Swartschewskia papyracea</i> )	35	10	Диатомовые, <i>Trebouxiophyceae</i> , <i>Synechococcus</i> , <i>Cyanobium</i>
1H	4, напротив м. Хобой	Neuston	-	0	13	<i>Actinobacteria</i> (Galach'yants и др., 2017)

Филогенетический анализ показал, что ни одна из последовательностей не кластеризовалась с представителями группы Near T4 (рис. 12). Семь последовательностей вошли в группу Far T4, содержащую культивированные фаги *Escherichia* фаг 121Q и RM378.

Группа CyaT4 объединила остальную часть последовательностей (78 последовательностей), 65 из них образовало 14 кластеров. Сформировавшимся считали кластер при наличии более одной последовательности из биоплёнок Байкала. Четыре кластера (Cluster 2, 5, 9, 11) включали последовательности планктонных бактериофагов из двух котловин оз. Байкал (Butina et al., 2010), (один кластер с байкальской группой B4 и три кластера с последовательностями, которые не образовали группу B), девять кластеров (Cluster 1, 3, 4, 7, 8, 10, 12, 13, 14) содержали последовательности байкальских биоплёнок, причём кластеры 1 и 14

состояли только из нейстонных последовательностей, кластеры 3 и 12 из последовательностей фагов из губки, кластеры 4 и 8 были сформированы последовательностями из цианобактериальных обрастаний. Остальные кластеры (7, 10, 13) содержали как последовательности из байкальских биоплёнок, так и последовательности из других экотопов и водоемов. Кластер 6 представлен последовательностями из озер Бурже и Анси, сходство последовательностей из этого кластера варьировало от 92 до 98,5%. Остальные 13 последовательностей внутри группы Cyano T4 не формировали кластеры.



Рисунок 12 – Таксономическое дерево, сформированное на основе *g23* последовательностей T4-подобных фагов. Последовательности из этого исследования выделены жирным, точками обозначены культивируемые представители

Иерархический кластерный анализ, который включал последовательности из различных местообитаний, доступных в базе NCBI:

заливов, почв, озёр, гидротермальных источников, рек, сточных вод, болот, показал, что сообщества вирусов из биоплёнок Байкала располагаются на дендрограмме ближе к планктонным сообществам из северной и южной котловины озера (рис. 13). Характер распределения отражает наиболее близкое родство вирусных сообществ различных экотопов оз. Байкал и меньшее сходство с другими экосистемами.

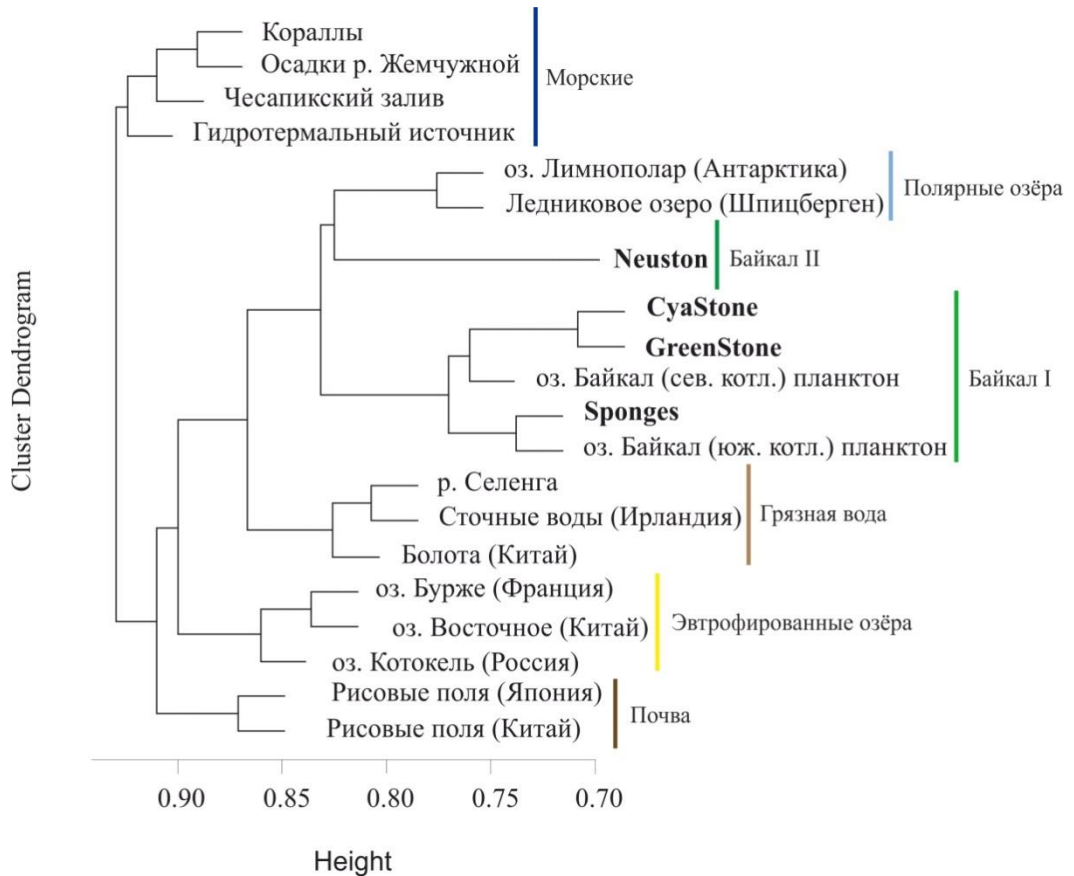


Рисунок 13 – UPGMA-дендрограмма, построенная с помощью иерархического кластерного анализа (hclust). Сообщества из байкальских биоплёнок выделены жирным

При этом по характеру ветвления на дендрограмме можно проследить тенденцию кластеризации сообществ в зависимости от физико-химических параметров среды. Так, бактериофаги из морей и эстуариев рек формируют «морскую» кладу. Как следует из анализа, последовательности бактериофагов биоплёнок и водной толщи оз. Байкал группируются вместе, а

не с последовательностями фагов из других водоемов, формируя «байкальский» кластер.

Множество работ, появившихся в последнее время по исследованию биоразнообразия вирусов в морских и пресных экосистемах, в той или иной мере предполагают их анализ с точки зрения биогеографии.

Понимание распределения природных бактериофагов имеет большое значение для выяснения их влияния на популяции клеток-хозяев, для анализа структуры микробного сообщества и, следовательно, для прогнозирования крупномасштабных планетарных процессов. Существует четыре модели биогеографии микробов (Chow, Suttle, 2015), также применимые к вирусам: 1) состав сообщества не определен местными или региональными факторами, 2) структура сообщества обусловлена условиями в местной среде обитания, где изменения в структуре сообщества определяются различиями в таксонах (все есть везде, но среда отбирает), 3) структура сообщества определяется тем, в какой степени таксоны могут перемещаться в это конкретное место (т. е. ограничение распространения), 4) ограничение распространения и условия окружающей среды определяют состав сообщества.

Очевидно, вирусное сообщество Байкала можно рассматривать в свете четвертой модели, основываясь на том, что оно формировалось многие миллионы лет обособленно, в условиях низких температур, малого количества питательных веществ, как продемонстрировано на примере байкальских рыб и губок (Efremova et al., 2002; Kontula, Kirilchik, Väinölä, 2003), что, в свою очередь, и подтверждает кластерный анализ вирусных сообществ озера.

Древние озёра представляют собой уникальные обособленные экосистемы, формировавшиеся на протяжении миллионов лет. До наших исследований информации о вирусах древних озёр не было. Первые сведения о генетическом разнообразии бактериофагов озёр Байкал (Butina и др., 2010; Butina et al., 2012; Butina et al., 2015b; Potapov et al., 2018; Potapov et al., 2013) и Хубсугул (Butina et al., 2014) появились в последнее десятилетие.

В данной работе с использованием праймеров, фланкирующих фрагмент гена основного капсидного белка gp23, исследованы T4-подобные бактериофаги в биоплёнках, сформированных на биогенных и абиогенных субстратах, и в поверхностном микрослое воды оз. Байкал.

По результатам BLAST-анализа большинство полученных нами последовательностей на нуклеотидном уровне имело наибольшее сходство с последовательностями из озёр Байкал, Бурже, Анси, Восточное, а не с последовательностями из других экосистем и биотопов. Вероятно, подобное родство можно объяснить сходством в составе бактерий – хозяев бактериофагов – в этих озёрах.

Филогенетический анализ показал, что девять кластеров содержали только последовательности из биоплёнок, что может свидетельствовать об уникальности этих генотипов, присущих только байкальским биоплёнкам (обособленность формирования), 28 последовательностей группировалось с ранее полученными последовательностями из планктона.

Очевидно, часть планктонных вирусов попадает на дно прибрежной зоны озера и оседает на камнях и губках. Кроме того, возможна и инфекция бактерий, обитающих в биоплёнках камней, губок и ПМС, планктонными бактериофагами. В целом, большая часть последовательностей (91,8%) фагов вошла в группу Суано T4, которая включает культивированные цианофаги.

По данным, полученным ранее (Timoshkin et al., 2016; Belykh et al., 2017) и в настоящей работе, цианобактерии доминируют по биомассе в донных биоплёнках литоральной зоны оз. Байкал, а в поверхностном микрослое озера, напротив, зафиксирована очень малая доля цианобактерий, но выявлено доминирование фило типов порядка Pelagibacterales (SAR11) (Galach'yants et al., 2017). Фаги, поражающие микроорганизмы данного таксона, также находятся в группе Суано T4.

В этой связи, возможно, некоторые последовательности бактериофагов из биоплёнок принадлежат цианофагам, но об этом можно судить только по кластеру, где есть культивированные цианофаги. В остальном группа Суано

T4, не оправдывает своего названия, имея в своём составе культивированных бактериофагов, не относящихся к цианофагам (например, *Pelagibacter phage* и Smp14).

Наиболее представительным является кластер 9, в нём находится 12 последовательностей биоплёнок и последовательность из планктона южной котловины оз. Байкал, которая не сформировала байкальскую группу в предыдущем исследовании. Вероятно, представители этого кластера – одни из наиболее встречаемых генотипов в биопленках южной котловины Байкала.

Ни одна из последовательностей не попала в группу Near T4. В Far T4 находится бактериофаг *Escherichia* 121Q, выделенный из *E. coli*, очевидно, что T4-бактериофаги из Байкала, входящие в эту группу, также поражают патогенные и/или условно-патогенные бактерии. Примечательно, что все 7 последовательностей, вошедшие в Far T4, получены из губок.

Ранее в исследовании цианофагов по гену *g20* в оз. Байкал из выжимки тела губки *L. baicalensis* показано, что четыре кластера содержали гены цианофагов как из губки, так и из планктона озера (Butina et al, 2015b). Присутствие в губках вирусов, сходных с планктонными, объяснено естественной биофильтрацией губок. В составе губки выявлено шесть генотипов цианофагов, два из которых в воде оз. Байкал не обнаружены, что свидетельствует в пользу действительного участия цианофагов в функционировании сообщества губок.

В нескольких исследованиях с использованием таргетного секвенирования по Сенгеру гена *g23* продемонстрировано наличие для морей, пресных водоёмов, почв, эстуариев как собственных «эндемичных» кластеров, так и сходных последовательностей некультивированных T4-подобных фагов, распространенных во многих экосистемах. Данный факт привел к предположению о том, что некоторые вирусы являются космополитами и поражают аналогичные виды хозяев, а часть их обладает уникальным происхождением (Breitbart, Miyake, Rohwer, 2004; Short, Suttle,

2005). К тому же фаги способны поражать хозяев из различных биомов, как это было установлено ранее в экспериментах (Bellas, Anesio, 2013; Bonilla-Findji et al., 2009; Sano et al., 2004).

Иерархический кластерный анализ показал, что сообщества вирусов из биоплёнок Байкала располагаются на дендрограмме ближе к планктонным сообществам из северной и южной котловины озера. Характер распределения отражает наиболее близкое родство вирусных сообществ различных экотопов оз. Байкал между собой и меньшее сходство с другими экосистемами, что может определяться, как физико-химическими параметрами среды обитания, так и зависеть от происхождения водоемов, времени его образования и обособленностью. Следует отметить, что сообщества Т4-подобных бактериофагов, последовательности которых получены ранее из близко расположенных к оз. Байкал водоемов: р. Селенга (Butina et al., 2015a) и оз. Котокельское (Butina et al., 2013) не группируются с байкальскими. В настоящее время экологическое состояние р. Селенга – крупнейшего притока оз. Байкал – ухудшается вследствие антропогенного загрязнения, трофический статус вод реки продолжает увеличиваться (Sorokovikova et al., 2019). Озеро Котокельское находится от оз. Байкал на расстоянии 2 км и сообщается с ним через систему мелких рек. Ранее показано, что оз. Котокельское является эвтрофным водоемом, где регулярно происходят цианобактериальные цветения (Belykh et al., 2011). Возможно, поэтому последовательности из этих водоемов не группируются с последовательностями бактериофагов из бентоса, планктона и нейстона оз. Байкал.

Сообщества вирусов из губки расположились на графике ближе к точке с планктонными последовательностями из южной котловины Байкала. Наблюдаемый факт может быть вызван тем, что большая часть вирусов проникает в губку из водной толщи в результате фильтрационного питания животных. Известно, что губки способны прогонять через свое тело в сутки до 5520 л воды на 1 кг массы (Казаринова и др., 1994).

Последовательности из обрастаний камней имели отличие от таковых в планктоне, нейстоне и биоплёнках губок, что можно объяснить значительным различием состава гетеротрофных бактерий планктона и бентоса/перифитона, как показано в ранних работах (Parfenova, Gladkikh, Belykh, 2013), наличием в биоплёнках камней большого количества нитчатых цианобактерий и водорослей (Timoshkin et al., 2016; Belykh et al., 2017). Кроме того, сообщества вирусов биоплёнок камней с преобладанием водорослей и цианобактерий отличались друг от друга, что является отражением разного видового состава, как доминирующих групп, так и минорных видов. В первом случае камни отобраны в урезовой зоне на глубине не более 1 м, а цианобактериальные биоплёнки подняты с глубины 6, 9 и 36 м.

Сообщество бактериофагов поверхностного микрослоя воды заметно отличается от других вирусных сообществ оз. Байкал, что подтверждается обособленностью и уникальностью этого экотопа, влиянием на нейстон гидрофизических факторов, таких как ветер, солнечная радиация, температура, а также своеобразным составом бактерионейстона, как показано ранее (Галачьянц и др., 2018). К тому же *g23*-сообщества нейстонных и планктонных фагов Малого моря формируют отдельный кластер (неопубликованные данные), очевидно, в связи с тем, что мелководный пролив Малое море, как и поверхностный микрослой воды подвержены влиянию аэрозольных переносов, которые могут определять распространение вирусов и обособленное формирование сообществ бактериофагов в проливе Малое море.

Таким образом, впервые получены нуклеотидные последовательности T4-подобных бактериофагов из биоплёнок, сформированных на абиотических и биотических субстратах и из поверхностного микрослоя воды оз. Байкал.

## ГЛАВА 5. АНАЛИЗ G23 ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БАКТЕРИОФАГОВ ОЗ. БАЙКАЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Максимальная длина перекрытых парных ридов составила 490 нуклеотидов (нк) без учета праймеров. Несколько последовательностей было более чем 490 нк, но они исключены после контроля качества и удаления химерных последовательностей. Кривая насыщения (уровень кластерного анализа 97% сходства) показала, что проба проанализирована в достаточном объёме, как видно по выходу кривой «плато» (рис. 14).

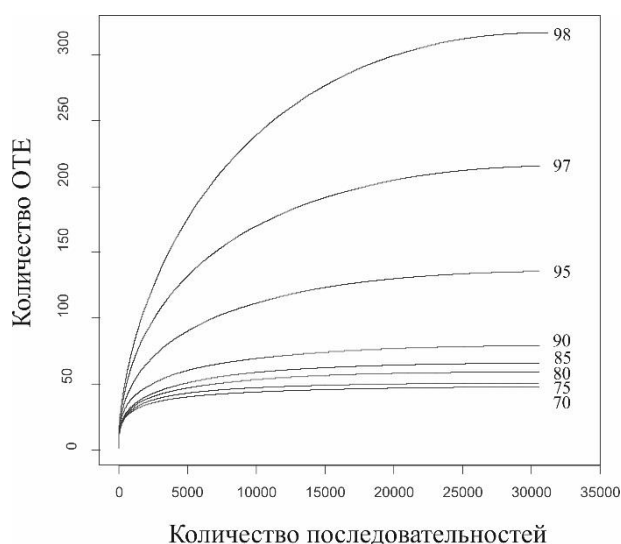


Рисунок 14 – Кривые насыщения при разных порогах сходства, без учета синглетонов

В результате высокопроизводительного секвенирования и обработки первичных данных получена 33701 последовательность фрагмента гена *g23*. Кластерный анализ позволил идентифицировать 1244 OTU. После удаления синглетонов и даблтонов (88,6% OTU), осталась 141 OTU (11,3% OTU). 86 OTU (60,9%) имело ближайших родственников среди репрезентативных последовательностей некультивируемых вирусов из озёр Бурже и Анси (Zhong, Jacquet, 2014). Однако, 28 OTU (19,8%) характеризовались высоким

сходством с байкальскими *g23* клонами, которые ранее идентифицированы в северной и южной котловине озера методом Сенгера (Butina et al., 2010). Остальные ОТЕ были сходны с клонами из озера Восточное (Китай) (Wang et al., 2015), рисовых полей Китая и Японии (неопубликованные данные), Чесапикского залива (Jamindar et al., 2012), вод болотных угодий Китая (Zheng et al., 2013), донных осадков дельты Жемчужной реки (Китай), озера Котокельское (Россия) (Butina et al., 2013), Саргассового моря (неопубликованные данные) (табл. 4).

Таблица 4 – Количество ОТЕ BS OTU и число последовательностей наиболее схожих с клонами из различных экосистем

Местоположение	Количество BS OTU	Количество последовательностей	Ссылка
Бурже и Анси (Франция)	86 (60,9%)	20549	(Zhong, Jacquet, 2014)
Байкал, север (Россия)	14 (9,9%)	4371	(Butina et al., 2010)
Байкал, юг (Россия)	14 (9,9%)	3078	(Butina et al., 2010)
Восточное (Китай)	10 (7,1%)	2454	(Wang et al., 2015)
Почва рисовых полей (Китай)	7 (4,9%)	1112	(Li et al., 2017 неопубликованные данные)
река Жемчужная (Китай)	3 (2,1%)	44	(He, 2016 неопубликованные данные)
Водно-болотные угодья (Китай)	3 (2,1%)	20	(Zheng et al., 2013)
Чесапикский залив (США)	1 (0,7%)	654	(Jamindar et al., 2012)
Почва рисовых полей (Япония)	1 (0,7%)	100	(Cahyani et al., 2007 неопубликованные данные)
Саргассово море (Атлантический океан)	1 (0,7%)	29	(Goldsmith et al., 2015 неопубликованные данные)
Котокель (Россия)	1 (0,7%)	3	(Butina et al., 2013)

Распределение последовательностей в ОТЕ было неравномерным. Количество ОТЕ с более чем 100 последовательностями составило 14,8%. Гистограмма показывает только наиболее многочисленные ОТЕ (рис. 15).

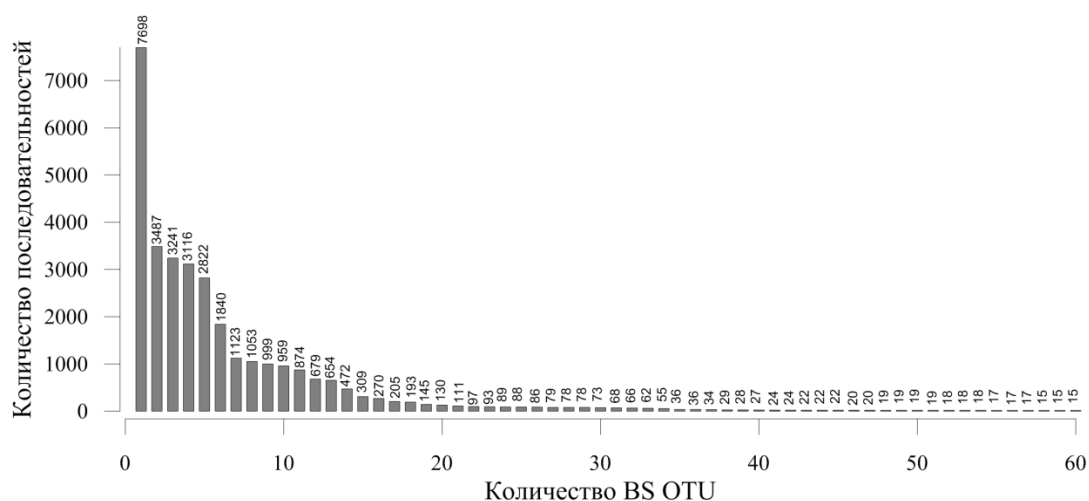


Рисунок 15 – Гистограмма соотношения BS OTU к количеству последовательностей в них входящих. Показаны 60 ОТЕ. Наибольшая численность последовательностей соответствует BS OTU 1 (7698). После BS OTU 21 (111 последовательностей) идёт спад до минимальных значений

Таблица 5 иллюстрирует наиболее распространенные (доминирующие) ОТЕ (> 100 последовательности в каждой).

Таблица 5 – Результаты BLAST анализа репрезентативных последовательностей фрагмента гена *g23* Т4-подобных бактериофагов из планктона южного Байкала. Представлены наиболее многочисленные (доминантные) ОТЕ (>100 последовательностей в каждой).

ОТЕ	Количество (доля) последовательностей	Источник изоляции ближайшего родственника	Номер в GenBank	Сходство (%)	Ссылка
1	2	3	4	5	6
BS OTU 1	7698 (22,8%)	Бурже и Анси (Франция)	АНУ87124	94	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 2	3487 (10,3%)	Бурже и Анси (Франция)	АНУ87260	98	(Zhong, Jacquet, 2014)

1	2	3	4	5	6
BS OTU 3	3241(9,6%)	Байкал, север (Россия)	ADA61149	100	(Butina et al., 2010)
BS OTU 4	3116 (9,2%)	Бурже и Анси (Франция)	AHU87216	98	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 5	2822 (8,3%)	Бурже и Анси (Франция)	AHU87232	95	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 6	1840 (5,4%)	Восточное (Китай)	AKZ31894	80	(Wang et al., 2015)
BS OTU 7	1123 (3,3%)	Байкал, юг (Россия)	ADJ57322	81	(Butina et al., 2010)
BS OTU 8	1053 (3,1%)	Почва рисовых полей (Китай)	BAW82038	77	неопубликованные данные
BS OTU 9	999 (2,9%)	Бурже и Анси (Франция)	AHU87144	89	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 10	959 (2,8%)	Байкал, север (Россия)	ADA61143	96	(Butina et al., 2010)
BS OTU 11	874 (2,5%)	Байкал, юг (Россия)	ADJ57323	99	(Butina et al., 2010)
BS OTU 12	679 (2,0%)	Байкал, юг (Россия)	ADJ57320	98	(Butina et al., 2010)
BS OTU 13	654 (1,9%)	Чесапикский залив (США)	AFV99098	72	(Jamindar et al., 2012)
BS OTU 14	472 (1,4%)	Бурже и Анси (Франция)	AHU87275	99	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 15	309 (0,91%)	Байкал, юг (Россия)	ADJ57323	82	(Butina et al., 2010)
BS OTU 16	270 (0,80%)	Бурже и Анси (Франция) (France)	AHU87190	93	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 17	205 (0,60%)	Восточное (Китай)	ADI87617	89	неопубликованные данные
BS OTU 18	193 (0,57%)	Бурже и Анси (Франция)	AHU87216	94	(Zhong, Jacquet, 2014)
BS OTU 19	145 (0,43%)	Восточное (Китай)	AKZ31853	74	(Wang et al., 2015)
BS OTU 20	130 (0,38%)	Восточное (Китай)	AKZ31906	62	(Wang et al., 2015)
BS OTU 21	111 (0,32%)	Бурже и Анси (Франция)	AHU87165	93	(Zhong, Jacquet, 2014)

Ближайшими родственниками из культивируемых бактериофагов оказались *Synechococcus* фаг S-CAM1 (NC\_020837) (79% сходства) (Henn *et al.* 2001, неопубликованные данные), хозяином которого является штамм *Synechococcus* sp. WH7803 (Тихий океан), и цианофаг *Synechococcus* S-SM2 (YP\_004322275) (71% сходства) (Sullivan *et al.*, 2010), изолированный из штамма *Synechococcus* sp. WH8017 (Атлантический океан).

Филогенетический анализ (рис. 16) показал, что BS OTU последовательности распределились по двум группам Суано-T4 (95,8%) и Far-T4 (4,2%), демонстрируя высокое разнообразие T4-подобных бактериофагов в оз. Байкал. Ни одна последовательность не вошла в группу Near-T4. Большая часть BS OTU из группы Суано-T4 сформировало два больших кластера: один «байкальский» и один «смешанный», два кластера с культивированными цианофагами и несколько мелких кластеров, кроме того, на дереве присутствовали отдельные ветви.

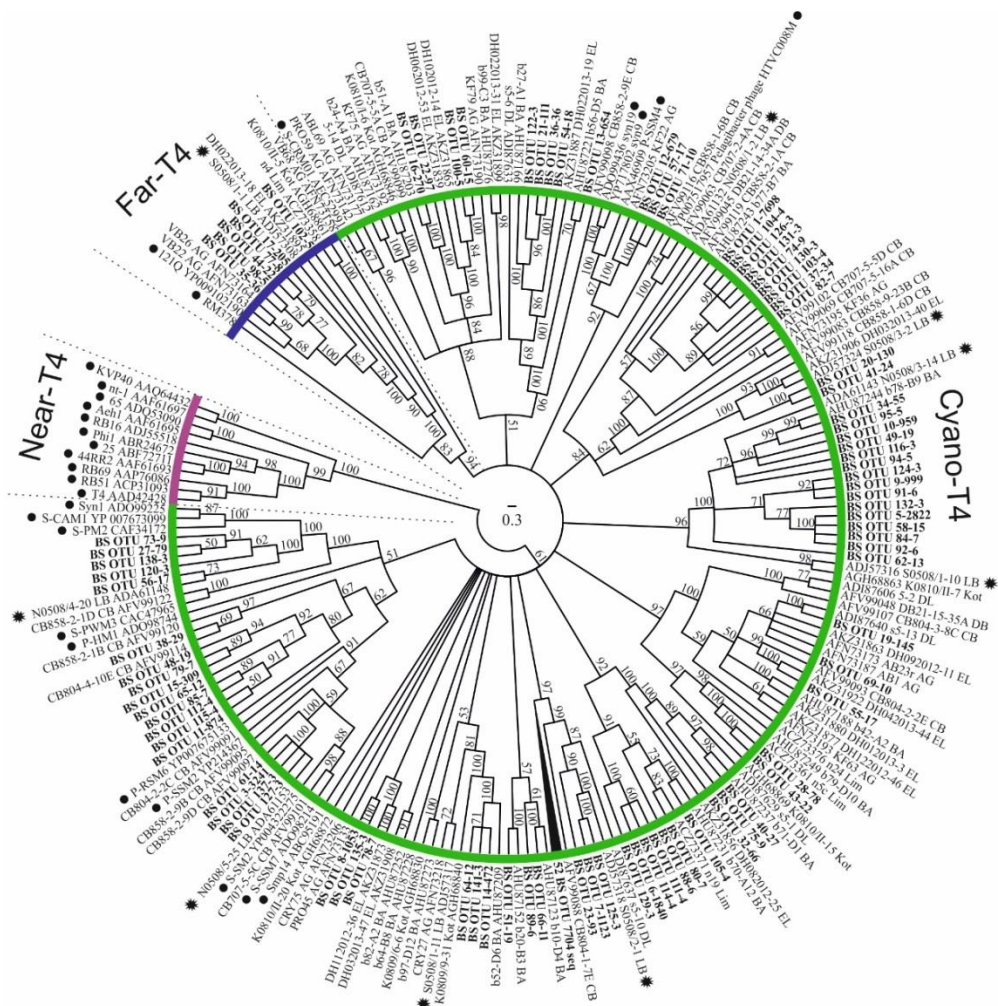


Рисунок 16 – Дерево, построенное на основе фрагментов гена *g23* бактериофагов. Кружком отмечены культивированные бактериофаги, звёздочкой – байкальские последовательности, полученные ранее методом Сенгера. Жирным выделены BS OTU. Источник изоляции: LB – озеро Байкал, EL – озеро Восточное, CB – Чесапикский залив, VA – озёра Бурже и Анси, DL – озеро Дунху, DB – залив Делавэр, AG – арктические льды

Байкальский кластер состоял из 52 ОТЕ (7704 последовательности, 22,8%). Смешанный кластер представлен 9 ОТЕ (7765 последовательностями, 23,0%) и *g23* фрагментами из других экосистем. Два мелких кластера, содержащие культивируемые цианобактерии, были смешанными – 18 BS OTU (4637 последовательностей, 13,7%) и 3 BS OTU (706 последовательностей, 2,1%).

Сходство между последовательностями оз. Байкал, определенными ранее (Butina et al., 2010) и полученными в данном исследовании, составило от 15 до 100%.

Микроразнообразие (нуклеотидное разнообразие,  $\pi$ ) составило 0,38, что выше, чем разнообразие из образцов других пресных водоёмов, кроме оз. Лимнополар. Для озера Котокельское оно составило – 0,36, ледникового озера (Шпицберген) – 0,35, Восточного (Китай) – 0,28, Лимнополар (Антарктика) – 0,42.

С помощью метрики дистанций UniFrac и метода главных компонент (РСА) определено бета-разнообразие сообществ и продемонстрировано отличие сообществ бактериофагов из пресноводных и морских экосистем (рис. 17).

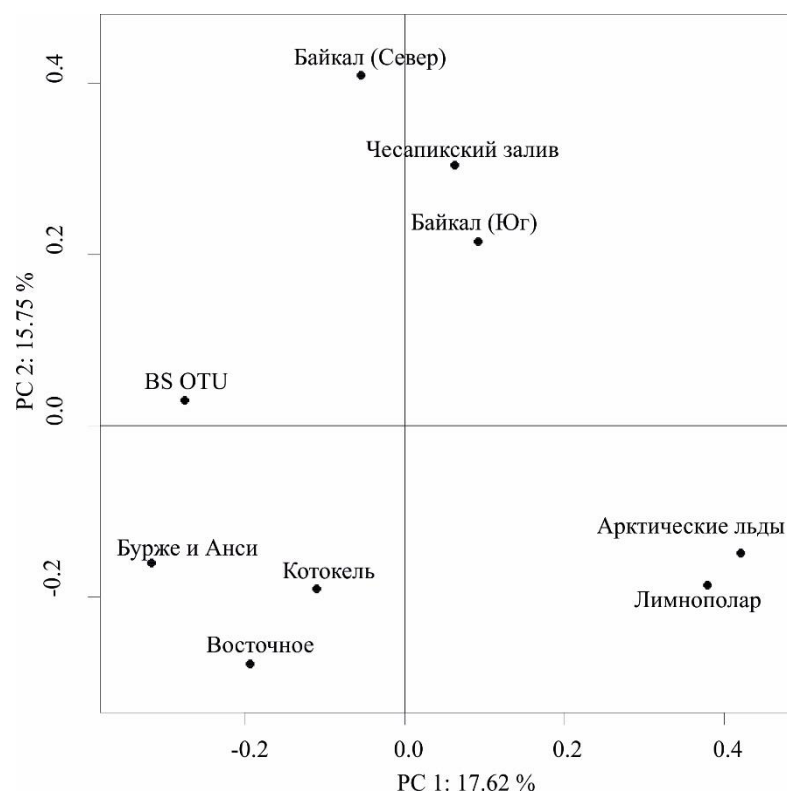


Рисунок 17 – UniFrac анализ *g23*-сообществ бактериофагов. Метод главных компонент (PCA)

Высокое родство последовательностей из Байкала с последовательностями гена *g23* бактериофагов из альпийских озёр Бурже и Анси связано, вероятно, со значительным сходством озёр по гидрохимическим и гидрофизическим показателям (высота над уровнем моря, общий фосфор, общий азот, нитраты, pH) (Jacquet et al., 2008; Perga et al., 2016; Zhong, Jacquet, 2014), а также обусловлено близким составом планктона. В метагеномных исследованиях 16S рРНК-ампликонов показано, что филы Actinobacteria, Proteobacteria и Bacteroidetes доминируют в планктоне озёр Бурже и Анси (Debroas et al., 2009; Humbert et al., 2009). В оз. Байкал доминирующими филлами являются Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Verrucomicrobia и Acidobacteria, среди многочисленных представителей которых найдены близкие родственники из озера Бурже (Kurilkina et al., 2016; Mikhailov et al., 2015; Parfenova, Gladkikh, Belykh, 2013).

Значительное число ОТЕ, имеющих большее сходство с последовательностями из альпийских озёр, чем из озера Байкал может быть объяснено разным количеством последовательностей, полученных из этих озёр: 190 последовательностей из Бурже и Анси и 41 последовательность из Байкала.

Бактериофаг *Escherichia* 121Q, изолированный из *E. coli*, принадлежит группе Far-T4 (Larín *et al.* неопубликованные данные). T4-подобные бактериофаги из озера Байкал, вошедшие в эту группу, весьма вероятно, способны инфицировать представителей семейства *Enterobacteriaceae*, которое включает множество патогенных и условно патогенных представителей.

Фагов из группы Near-T4, куда входят вирусы колиформных бактерий (например, фаг T4), не удалось идентифицировать. По последним данным численность *Enterobacteriaceae* в оз. Байкал низкая (Shtykova *et al.*, 2019). Как правило, энтеробактерии обитают в поверхностном слое воды, а чаще всего локально – в литоральной зоне, около населенных пунктов. Поэтому, вероятно, что численность T4-энтерофагов, даже если они присутствовали в образце, была экстремально низкой. В связи с этим необходимо детально с применением специфических маркеров изучить T4-подобные вирусы прибрежных районов Байкала, особенно в местах с интенсивной туристической и рекреационной активностью.

Группа Cyano-T4, предположительно, состоит не только из цианофагов, несмотря на своё историческое название, согласно А. Комео и Г. Криш, но и содержит также бактериофаги, инфицирующие *Proteobacteria* (например, *Pelagibacter* фаг и Smp14). Исследуемый период отличается максимумом развития пикоцианобактерий, так, в предыдущие годы в августе их численность достигала 3 млн. кл/мл (Belykh, Sorokovikova, 2003; Belykh *et al.*, 2006), следовательно можно предположить, что в это время присутствовало большое количество фагов, поражающих цианобактерии. Однако нельзя утверждать о доминировании цианофагов, т.к. только последовательности,

которые вошли в кластер с культивированными цианофагами, могут принадлежать с большой долей вероятности к цианофагам. Максимальное количество цианобактерий обнаружено в эуфотическом слое, на глубине 0-25 м, тогда как в этом исследовании пробы отбирали до 100 м, поэтому доля «нецианобактериальных» фагов, вероятно, увеличивалась. В то же время в микробиомах байкальского нейстона и планктона обнаружена значительная доля альфапротеобактерий методом пиросеквенирования 16S рРНК-ампликонов (Galach'yants et al., 2017; Kurilkina et al., 2016), что также может указывать на наличие фагов гетеротрофных бактерий в группе Cyano-T4.

Ранее байкальские последовательности вирусов, полученные методом Сенгера, сформировали 9 кластеров (B1–B9) на филогенетическом дереве. BS OTU дополнили и сформировали новые кластеры, что указывает на более глубокое секвенирование и наиболее полную оценку вирусного разнообразия.

Озёра Бурже и Анси являются олигомезотрофным и олиготрофным, соответственно (Zhong, Jacquet, 2014). На графике пул генов BS OTU занимает промежуточное положение между ранее полученными байкальскими сообществами и фаговыми сообществами из озёр Бурже и Анси. Расположение на дендрограмме байкальских сообществ из северной и южной котловины рядом с сообществом из Чесапикского залива можно объяснить тем, что воды залива разбавлены притоком рек. Из-за градиента солёности сообщества бактерий меняются от пресноводных до морских видов, как сообщается в предыдущих исследованиях (Bouvier, Giorgio del, 2002; Xia et al., 2017). В Чесапикском заливе бактерии класса *Betaproteobacteria* преобладают в пресноводной зоне (Bouvier, Giorgio del, 2002). В Байкале они занимают также доминирующую позицию (Parfenova, Gladkikh, Belykh, 2013). Поскольку вирусы неразрывно связаны со своими хозяевами, подобный бактериальный состав предполагает сходство фагов.

Примечательно, что данные из других экосистем получены методом Сенгера и содержали несколько последовательностей (от 18 до 190), то есть

глубина выборки в этих наборах значительно ниже, чем в полученных методом высокопроизводительного секвенирования в настоящем исследовании.

Предположительно, основная причина отделения BS OTU от образцов Байкала, определенных ранее, заключалась в том, что BS OTU отобран с глубины 0-100 м, а образцы, полученные в 2010 г. – на горизонтах от 5 до 10 м. Другие образцы, представленные на рисунке 17, также взяты на глубине 20 м.

В целом, таргетное секвенирование с использованием высокопроизводительного секвенирования позволило наиболее полно оценить разнообразие T4-подобных вирусов в водоемах, как показано ранее (Tian, 2015) и продемонстрировано в этом исследовании.

## ГЛАВА 6. МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРИОПЛАНКТОНА ПЕЛАГИАЛИ ОЗ. БАЙКАЛ

Для анализа виромов использовали онлайн сервис MG-RAST (<https://www.mg-rast.org/>). Так как MG-RAST имеет свою собственную предобработку прочтений, на сервер были загружены «сырые» данные. Последовательности левых и правых ридов, объединённые на стадии обработки MG-RAST, имели среднюю длину 493-506 п.н. Информация по образцам, обработанным на сайте MG-RAST, отражена в таблице (табл. 6).

Таблица 6 – Суммарные данные секвенирования каждого вирома

Образец	GC-состав, %	«Сырые» данные	Загружено в MG-RAST	Аннотировано как вирусные	Содержание 16S рРНК последов.
BVP1	43	3223426	1474135	20622	929
BVP2	44	4136035	1956295	37595	2675
BVP3	48	4106007	1732119	11958	5097
BVP4	46	4177374	1897967	10452	5819
BVP5	44	5106316	3616043	40682	6563
BVP6	48	3097289	2155698	20366	5087

### 6.1 Химический анализ воды

Гидрофизические параметры: температура, прозрачность по диску Секки и гидрохимические показатели, такие как рН, концентрация общего фосфора и азота, кислорода, фосфатного фосфора, нитратного и нитритного азота, кремния, органического углерода, а также содержание хлорофилла *a* в пелагической зоне озера Байкал приведены в таблице 7. На основании полученных данных (содержание хлорофилла *a*, общего фосфора и азота, прозрачности по диску Секки), согласно классификации Р. Волленвейдера и Д. Керекеса, трофическое состояние озера Байкал в период исследования было определено как олиготрофное с рядом районов, имеющих мезотрофный статус (Vollenweider, Kerekes, 1982).

Таблица 7 – Физико-химические параметры воды и численность вирусов и бактерий на станциях отбора проб (средние значения в слое 0-50 м, кроме прозрачности).

Показатели	BVP1	BVP2	BVP3	BVP4	BVP5	BVP6
Температура воды, °С	0,4–1,3 (0,75*)	2,7–2,8 (2,76)	2,7-2,8 (2,69)	1,9 (во всём слое)	7,66	4,2-9 (5,7)
рН	7,92–7,98 (7,95)	7,75–7,82 (7,79)	8,07	7,98	7,9	8,01
N <sub>общ</sub> , мг/л	0,17–0,31 (0,23)	0,20–0,34 (0,29)	0,05-0,22 (0,15)	0,10-0,19 (0,17)	0,17	0,14-0,19 (0,15)
P <sub>общ</sub> , мкг/л	11–15 (13)	10–12 (11)	12,8	10,9	8	8,7
ТОС, мг/л	0,7–1,3 (1,07)	1,7–1,9 (1,8)	1,4-2,4 (1,9)	1,33-1,52 (1,39)	2,03-2,35 (1,9)	1,67-1,84 (1,75)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , мг/л	0,001 (во всём слое)	0,001–0,003 (0,002)	0,001-0,002 (0,001)	0,0003	0,004	0,0002-0,006 (0,005)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/л	0,34–0,45 (0,39)	0,37–0,40 (0,39)	0,35-0,38 (0,37)	0,44-0,47 (0,46)	0,08	0,09-0,5 (0,178)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , мг/л	0,007	0,003	0,006	0,003	0,0087	0,00348
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , мкг/л	24–40 (30)	22–26 (24)	20-22 (21)	27-29 (28)	14	1-32 (7,5)
Si, мг/л	0,50-0,52 (0,51)	0,46-0,48 (0,47)	0,31-0,33 (0,31)	0,68-0,69 (0,69)	0,3	0,47-0,52 (0,49)
O <sub>2</sub> , мг/л	13,5–14,8 (14,3)	12,6–12,8 (12,7)	12,5-12,6 (12,6)	13-13,1(13,03)	9,81	10,8-11,9 (11,4)
Chl a, мкг/л	0,65–3,42 (2)	1,31–1,59 (1,40)	2,5	0,61	2,32	1,26
Вирусы, частиц/мл	2 (± 0,5) × 10 <sup>6</sup>	1,5 (±0,8) × 10 <sup>6</sup>	1,5 (±0,6) × 10 <sup>6</sup>	2,2 (±0,8) × 10 <sup>6</sup>	5 (±1,9) × 10 <sup>6</sup>	5 (±1,2) × 10 <sup>6</sup>
Бактерии, кл/мл	1,2 (± 0,4) × 10 <sup>6</sup>	0,13 (±0,3) × 10 <sup>6</sup>	0,15 (±0,04) × 10 <sup>6</sup>	0,31(±0,1) × 10 <sup>6</sup>	2,3 (±0,3) × 10 <sup>6</sup>	1,3 (±0,5) × 10 <sup>6</sup>
Прозрачность, м	11	16	8	16	6	8

\* арифметическое среднее, n=50

## 6.2 Таксономический состав виромов

Большая часть последовательностей не имела какого-либо сходства с последовательностями из баз данных (Рис. 18). Очевидно, это так называемая «viral dark matter» (вирусная тёмная материя) (Reyes et al., 2012), состав и структура которой остались неизвестными во всех исследованных виромах, полученных до настоящего времени (López-Bueno et al., 2009; Mohiuddin, Schellhorn, 2015).

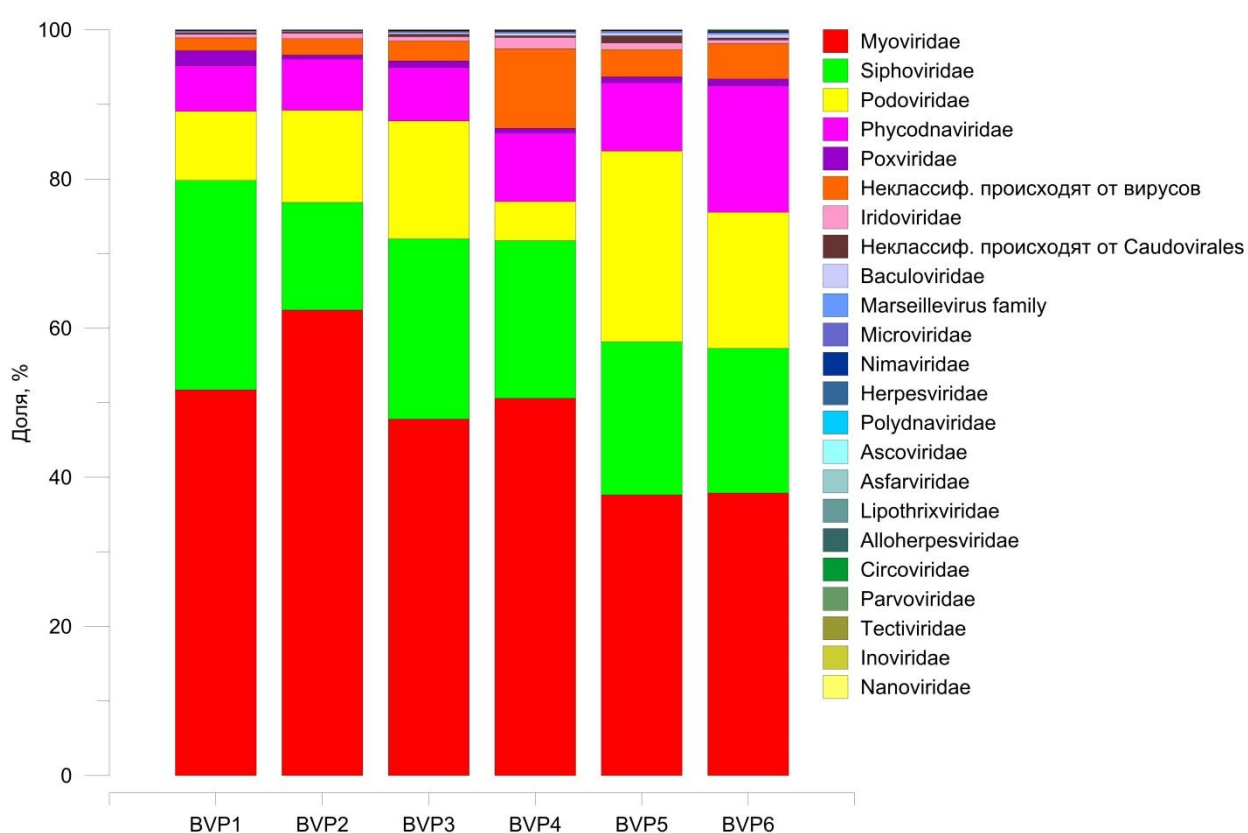


Рисунок 18 – Состав и структура виромов на уровне семейств из озера Байкал, база данных RefSeq 2019 (MG-RAST, e-value  $10^{-5}$ )

Доля представителей домена вирусы от всех аннотированных последовательностей в образцах различна: BVP1 – 8,8%, BVP2 – 4,5%, BVP3 – 0,7%, BVP4 – 0,5%, BVP5 – 1,9%, BVP6 – 1,6%. Большинство проанализированных последовательностей не имеют какой-либо

существенной гомологии с записями в базе данных ( $e$ -value меньше  $10^{-5}$ ), что типично для всех виромов, известных к настоящему времени.

К домену *Bacteria* отнесена значительная часть последовательностей (85,1-98,0%). ДНК бактерий присутствовала в вирусной фракции в большом количестве, несмотря на префильтрацию образцов через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм и обработку ДНКазой на стадии подготовки пробы. Вероятными причинами могут являться перенос генов (GTA), неправильно сформированные вирусоподобные частицы (с бактериальной ДНК), наличие бактериальных везикул и ультрамикробактерий. Подобную картину наблюдали при анализе виромов в озере Лох-Ней (Ирландия) (Skvortsov et al., 2016) и в других водоёмах.

Всего в образцах из оз. Байкал идентифицировано 21 семейство вирусов, поражающих широкий круг хозяев: бактерий, водоросли, птиц, рыб, насекомых, людей и др. Семейства *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Poxviridae* составили 97% от всех идентифицированных семейств (табл. 8). Основная часть идентифицированных последовательностей вирусов принадлежала хвостатым бактериофагам порядка *Caudovirales*, который включал в себя семейства *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*. Среди них преобладали фаги сем. *Myoviridae*, субдоминантами являлись фаги сем. *Siphoviridae*, самыми малочисленными были *Podoviridae*, кроме образца BVP5. В пробе BVP5 из пролива Малое Море – единственной из всех исследованных образцов – подовирусы занимали второе место, в BVP4 (3 км от м. Елохин) наблюдается большее количество неклассифицированных последовательностей, определенных до домена и меньшее количество сем. *Podoviridae*, по сравнению с другими виромами.

Вирусные последовательности в виромах, не смотря на значительное разнообразие, сходны по таксономическому составу, во всех доминировали бактериофаги порядка *Caudovirales*.

Таблица 8 – Состав вирусных сообществ на уровне семейств

Семейство	ДНК	Основные хозяева	Процентное содержание от всех вирусных семейств					
			BVP1	BVP2	BVP3	BVP4	BVP5	BVP6
<i>Mycoviridae</i>	дцДНК	Бактерии	51,721	62,417	47,792	50,583	37,635	37,881
<i>Siphoviridae</i>	дцДНК	Бактерии	28,071	14,427	24,159	21,134	20,527	19,385
<i>Podoviridae</i>	дцДНК	Бактерии	9,281	12,358	15,830	5,243	25,578	18,265
<i>Phycodnaviridae</i>	дцДНК	Водоросли	6,100	6,867	7,158	9,203	9,173	16,930
<i>Poxviridae</i>	дцДНК	Птицы, животные, человек	2,017	0,547	0,894	0,641	0,784	0,942
Неклассиф. (происходят от вирусов)		-	1,716	2,181	2,659	10,639	3,630	4,748
<i>Iridoviridae</i>	дцДНК	Насекомые, амфибии, рыбы, беспозвоночные	0,504	0,755	0,585	1,521	0,904	0,481
Неклассиф. (происходят от Caudovirales)	дцДНК	Бактерии	0,213	0,172	0,342	0,229	0,961	0,265
<i>Baculoviridae</i>	дцДНК	Насекомые	0,160	0,101	0,234	0,363	0,408	0,549
<i>Marseillevirus family</i>	дцДНК	Амёбы	0,087	0,087	0,142	0,162	0,223	0,186
<i>Microviridae</i>	оцДНК	Бактерии	0,024	0,002	0,025	0,038	0,012	0,014
<i>Nimaviridae</i>	дцДНК	Ракообразные	0,024	0,010	0,033	0,028	0,022	0,058
<i>Herpesviridae</i>	дцДНК	Животные, человек	0,019	0,042	0,016	0,076	0,049	0,083
<i>Polydnaviridae</i>	дцДНК	Насекомые	0,014	0	0	0	0,014	0
<i>Ascoviridae</i>	дцДНК	Беспозвоночные	0,009	0,002	0,025	0,0287	0,022	0,024
<i>Asfarviridae</i>	дцДНК	Насекомые, свиньи	0,009	0,013	0,025	0,047	0	0,068
<i>Lipothrixviridae</i>	дцДНК	Археи	0,009	0,002	0,016	0,028	0,012	0,068
<i>Alloherpesviridae</i>	дцДНК	Рыбы, амфибии	0,004	0,007	0,016	0,028	0,007	0,029
<i>Circoviridae</i>	оцДНК	Птицы, животные	0,004	0	0,008	0	0	0
<i>Parvoviridae</i>	оцДНК	Теплокровные животные, человек	0,004	0	0	0	0	0
<i>Tectiviridae</i>	дцДНК	Бактерии	0	0	0,025	0	0	0
<i>Inoviridae</i>	оцДНК	Бактерии	0	0	0,008	0	0,031	0
<i>Nanoviridae</i>	оцДНК	Растения	0	0	0	0	0	0,014

Пересечения видов между вирами продемонстрированы на рисунке 19. Большая часть видов имеет общий пул во всех вирах (190), наибольшим количеством пересечений (34) отличаются виры из южной котловины озера, что говорит о локальной приуроченности видов к данному местообитанию.

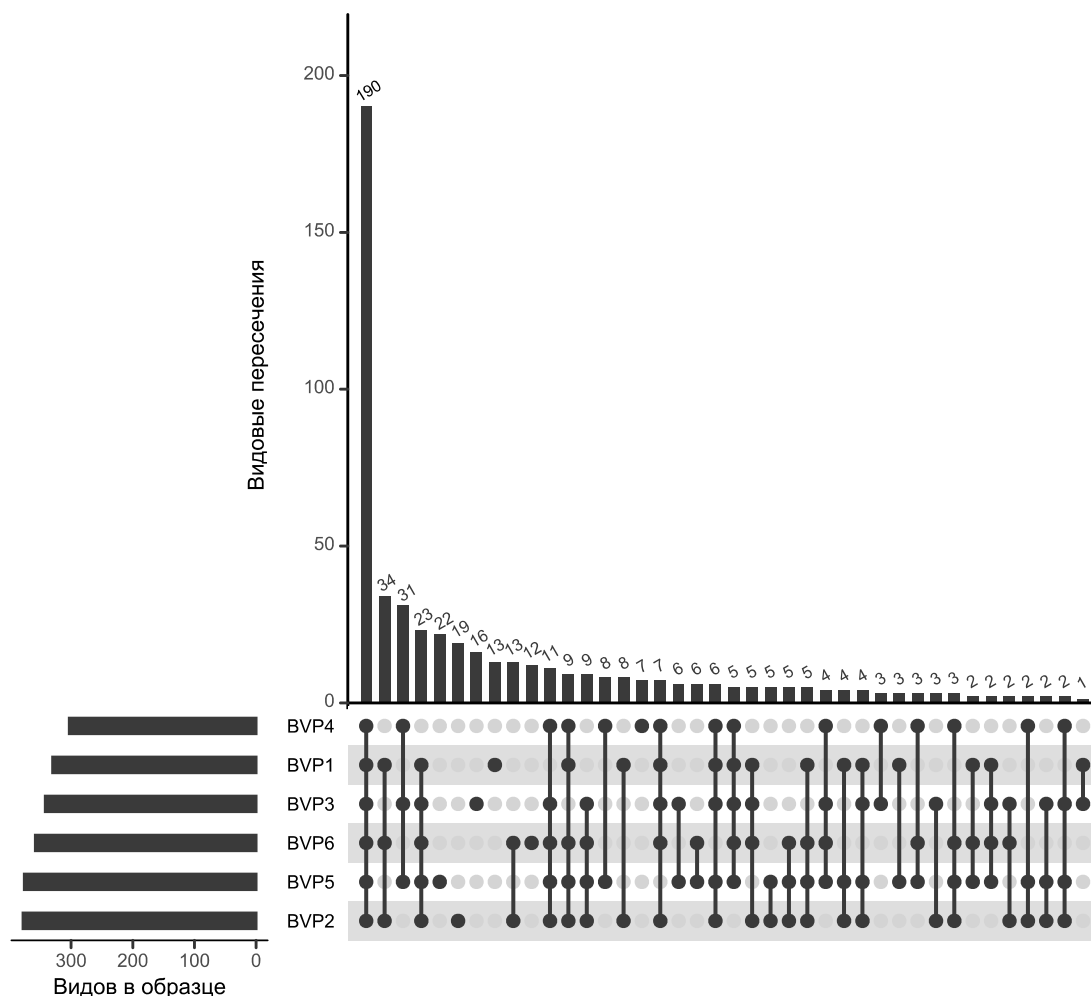


Рисунок 19 – График пересечения видов вирусов в вирусных сообществах оз. Байкал

Наиболее таксономически сложное сообщество вирусов по данным индексов разнообразия свойственно образцу, отобранному в сентябре в южной котловине озера на центральной станции пос. Листвянка – пос. Танхой (BVP6), наименее сложным – вирусное сообщество из пролива Малое Море (BVP5), август (табл. 9).

Таблица 9 – Индексы разнообразия по Шеннону на основе k-mers для виромов оз. Байкал

Образец	k-mers 3	k-mers 4	k-mers 5
BVP1	4	5,31	6,55
BVP2	4,01	5,31	6,56
BVP3	4,01	5,30	6,55
BVP4	3,99	5,29	6,54
BVP5	3,99	5,28	6,53
BVP6	4,04	5,34	6,61

В вирусном сообществе из литоральной зоны озера Байкал (30 м от берега, п. Б. Коты, глубина отбора 3,5 м) выявили несколько иной состав доминирующих семейств, более 90% из всех идентифицированных последовательностей приходилось на долю *Myoviridae*, *Poxviridae*, *Siphoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Podoviridae* а также *Mimiviridae*. *Baculoviridae*, *Iridoviridae* и *Herpesviridae* представляли 1,34%, 1,09% и 0,75% от всех последовательностей, соответственно. Минорные семейства содержали менее чем 0,5% от всех полученных последовательностей (Butina et al., 2019b).

В других пресных водоёмах среди вирусной фракции также преобладали вирусы порядка *Caudovirales*, кроме антарктического озера Лимнополар, арктических озёр архипелага Шпицберген и озёр Бурже и Павин (Франция). Как и в нашем случае, представители семейства *Myoviridae* наиболее многочисленны в озёрах Эри, Онтарио (Mohiuddin, Schellhorn, 2015), Восточное – (Ge et al., 2013), Мичиган (Watkins et al., 2015), в тропических водоёмах Сингапура (Gu et al., 2018) и в пресных водоёмах пустыни Сахара (Fancello et al., 2012).

Как известно, бактериофаги являются многочисленными и важными элементами в микробных сообществах водных экосистем, что свидетельствует об их высокой значимости в регуляции численности бактерий. Следует отметить, что преобладание бактериофагов в виромах также может быть вызвано их методическими «преимуществами» – фаги

легко изолируются из природных проб и по этой причине широко представлены в базах данных (Watkins et al., 2015).

Обращает на себя внимание низкое содержание в виромах оз. Байкал вирусов с одноцепочечной ДНК, их вклад составляет 0,002% – 0,04%, что сопоставимо с таковым в озере Лох-Ней (0,5%). В вириопланктоне озёр Павин и Бурже, напротив, на долю одноцепочечных вирусов приходилось 80% и 85%, соответственно (Roux et al., 2012). В антарктическом озере Лимнополар найдены сезонные различия в составе виромов: в весенней пробе доминировали оцДНК вирусы (74%), в летней они составляли всего 10%. В арктических озёрах (Шпицберген) подавляющее большинство принадлежало оцДНК вирусам (86%), с доминированием сем-ва *Circoviridae* (38,1%), вирусы с дцДНК составили только 2,8%, в основном состоящие из *Caudovirales* (1,8%) (Cárcer De et al., 2015). В девяти озёрах антарктического полуострова выявлено преобладание оцДНК вирусов, большинство из них принадлежало к неклассифицированным и сем-ву *Circoviridae* (Cárcer de et al., 2016). Наблюдаемый факт связан с методическими особенностями в подготовке метагеномных образцов для секвенирования. Примечательно, что в работах, где преобладали оцДНК вирусы применяли ДНК полимеразу phi29, которая преимущественно амплифицирует небольшие кольцевые геномы одноцепочечных вирусов (Roux et al., 2016).

### 6.3 Анализ последовательностей на уровне вида

С помощью онлайн сервиса MG-RAST проведена таксономическая идентификация последовательностей из виромов до вида (e-value  $10^{-5}$ ).

В исследуемых пробах из всех хитов, принадлежащих виду, большинство отнесено к цианофагам: BVP1 – 38,7%, BVP2 – 53,4%, BVP3 – 29,6%, BVP4 – 33,2%, BVP5 – 26,4%, BVP6 – 31,6%. Они представляли фаги, инфицирующие представителей родов *Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Phormidium* и вид *Microcystis aeruginosa*. Среди них доминировали *Prochlorococcus* фаг P-SSM2, *Synechococcus* фаг S-PM2, *Prochlorococcus* фаг PSS2, *Microcystis* фаг Ma-LMM01, *Phormidium* фаг Pf-WMP3.

Цианофаг P-SSM2 (*Myoviridae*), выделенный из *Prochlorococcus* sp. NATL1A, имеет линейную дцДНК с размером генома 252401 п.н. Большое количество хитов в байкальских виромах родственных фагам поражающих морской род *Prochlorococcus*, может быть связано с наличием ко́ровых генов (от англ. «core» – ядро), свойственных всем T4-подобным бактериофагам (Sullivan et al., 2005).

Цианомиовирус *Synechococcus* фаг S-PM2 (*Myoviridae*) с длиной генома 196280 п.н. изолирован из морской воды пролива Ла-Манш на культуре *Synechococcus* sp. WH7803. В фаге обнаружены гены *psbA* и *psbD*, кодирующие D1 и D2 основные компоненты реакционного центра фотосистемы II (Millard et al., 2004).

*Microcystis* вирус Ma-LMM01 (*Myoviridae*) с длиной генома 162109 п.н., содержащий 184 ORF и два гена тРНК (гены, позволяющие оптимизировать трансляцию в клетке хозяина), поражает токсичную цианобактерию *Microcystis aeruginosa*, выделенную из озера Миката в Японии. Геном кодирует сайт-специфическую рекомбиназу и два антирепрессора профага, что позволило сделать предположение о его способности интегрироваться в геном хозяина. В геноме фага обнаружен гомолог *nblA*, наличие которого указывает на возможность контроля фотосинтетической деятельности хозяина (Yoshida et al., 2008).

Наиболее многочисленными по количеству хитов после цианофагов в виромах были: *Flavobacterium* фаг 11b (BVP1 – 8,3%, BVP2 – 1,9% и BVP6 – 3,5%), в виромах BVP3 – *Staphylococcus* фаг G1 (6,5%), в BVP4 – *Clostridium* фаг 39-О (7,5%) и в BVP5 – *Pseudomonas* фаг LUZ24 (7,2%). *Flavobacterium* фаг 11b с размером генома 36012 п.н. принадлежит семейству *Siphoviridae*, его хозяином является психрофильная бактерия *Flavobacterium* sp. из арктического морского льда (Borriss et al., 2007). *Staphylococcus* фаг G1 (*Myoviridae*) поражает бактерий рода *Staphylococcus*, *Clostridium* фаг 39-О из семейства *Siphoviridae* инфицирует бактерии рода *Clostridium*, хозяевами *Pseudomonas* фаг LUZ24, представляющий сем-во *Podoviridae*, служат бактерии рода *Pseudomonas*.

Аннотированные последовательности фагов энтеробактерий имели следующее процентное содержание: BVP1 – 7,1%, BVP2 – 5,3%, BVP3 – 6,2%, BVP4 – 3,4%, BVP5 – 4,4%, BVP6 – 4,6%.

Большинство хитов семейства *Phycodnaviridae* в виромах BVP1, BVP2, BVP3 принадлежало вирусам одноклеточных водорослей *Ostreococcus* и *Acanthocystis turfacea*, в виромах BVP4 и BVP6 преобладали *Ostreococcus* вирус OsV5 и *Micromonas* sp. RCC1109 вирус MpV1, в BVP5 – *Ostreococcus* вирус OsV5 и *Paramecium bursaria Chlorella* вирус 1.

Среди представителей семейства *Poxviridae*, вызывающих заболевания человека и животных, большинство хитов определены как вирусы оспы свиней *Swinepox* (0,3–0,9%) (Afonso et al., 2002).

Таким образом, наибольшее количество аннотированных последовательностей принадлежало Т4-подобным вирусам семейства *Myoviridae*, которые являются литическими бактериофагами. Данный факт указывает на значимую экологическую роль литических фагов в планктоне оз. Байкал, а превалирование среди дцДНК фагов хитов близких к цианофагам свидетельствует о большом значении в микробных сообществах оз. Байкал вирусов, поражающих цианобактерии.

В озере Мичиган найдено большое количество хитов, относящихся к референсным геномам *Planktothrix* фаг PaV-LD (NC\_016564), *Burkholderia* фаг ВсерВ1А, и *Acanthamoeba polyphaga mimivirus*, а также к *Prochlorococcus* фаг P-SSM2. Аннотированные последовательности родственные морским видам, скорее всего, имеют сходный состав кобовых генов у морских и пресноводных представителей, что мы наблюдали и в виромах оз. Байкал. Также многочисленны были фаг-специфичные ORF, принадлежащие cro, cI-репрессор системе и HNH эндонуклеазам, которые отвечают за литическое и лизогенное развитие вирусной инфекции и латеральный перенос генов, что предполагает наличие лизогенных или потенциально лизогенных фагов в виромах озера Мичиган (Watkins et al., 2015).

Сходно с оз. Байкал, в озерах Онтарио и Эри наиболее многочисленным был порядок Caudovirales (92,4%) с преобладанием рода Т4-подобные вирусы. Наибольшее количество хитов принадлежало *Prochlorococcus* фагу P-SSM2 и *Synechococcus* фагу S-PM2. В свою очередь, в эвтрофном озере Лох-Ней преобладали хиты семейства *Podoviridae* (38,2%): *Thalassomonas* фаг ВА3, *Bordetella* фаг ВРР-1 и *Mycobacterium* фаг Мх8 (Skvortsov et al., 2016).

Вирома реки Амазонка характеризовалась доминированием оцДНК вирусов сем. *Microviridae* и *Circoviridae*, дцДНК вирусов сем. *Myoviridae* с наибольшим количеством хитов *Chlamydia* фага СРА39, *Raven circovirus* и *Prochlorococcus* фага P-SSM2, соответственно (Silva et al., 2017).

Отличительной чертой виромов двух притоков и центральной части эвтрофного озера Матока являлось преобладание дцДНК вирусов с доминирующим сем. *Podoviridae*. Среди фаговых генотипов доминировали вирусы, поражающие пресноводных *Flavobacteria* и *Proteobacteria*. Авторы определяли виды вирусов с помощью набора инструментов Genome relative Abundance and Average Size (GAAS). Согласно анализу, в пробах самыми многочисленными были штаммы *Puniceispirillum* фаг НМО-2011 и *Persicivirga* фаг P12024L, на их долю приходилось до 13% аннотированных последовательностей в каждом из виромов (Green et al., 2015).

#### 6.4 Функциональное аннотирование генов

Для функциональной аннотации прочтений применяли базы данных MG-RAST, включая четыре базы данных, позволяющие использовать иерархическую функциональную аннотацию: KEGG Orthology (KO), COG, eggNOG и SEED Subsystems.

С помощью SEED Subsystems в исследуемых образцах идентифицировали следующее количество хитов: BVP1 – 69486, BVP2 – 363448, BVP3 – 760984, BVP4 – 977039, BVP5 – 112990, BVP6 – 302353. К функциональной категории «Фаги, профаги, транспонируемые элементы и плазмиды» отнесены 27,4% классифицированных прочтений в пробе BVP1, 13,2% в BVP2, 2,04% в BVP3, 1,6% в BVP4, 5,5% в BVP5 и 3,7% в BVP6 (рис. 20). Это гены, связанные с репликацией фага и упаковкой вирусных частиц (например, терминаза, интеграза, геликазы, праймаза).

«Фаги, профаги» в виrome BVP1 представляли наибольшую часть этой группы (97% от всех классифицированных последовательностей категории), где 1,3% прочтений принадлежало агентам переноса генов (Gene Transfer Agents, GTA). Следует отметить, что в подгруппе с наибольшим количеством прочтений в категории «Фаги, профаги» 54,1% составляли «*rlt*-подобные стрептококковые фаги».

В других виромах основную долю составляла категория первого уровня – «Кластерные подсистемы». Примечательно, что в 6 виромах процентное соотношение этой категории варьировало в небольшом диапазоне (12,6-13,6%). Внутри категории (т.е. второго уровня) была самая многочисленная подкатегория «NULL». Подкатегория «NULL» может содержать некоторые неправильные назначения, что указывает либо на уникальность, либо на отсутствие последовательностей с известными функциями в базе данных SEED.

Сравнительный анализ байкальских виромов по функциональным категориям показал, что в подледный период доминировала категория «Фаги, профаги, переносимые элементы, плазмиды». Преобладание этой категории,

вероятно, свидетельствует об активной репликации (размножении) вирусов подо льдом.

Из анализа можно вывести предположение, что только в подлёдный период сообщество вирусов имеет максимальные темпы репликации.

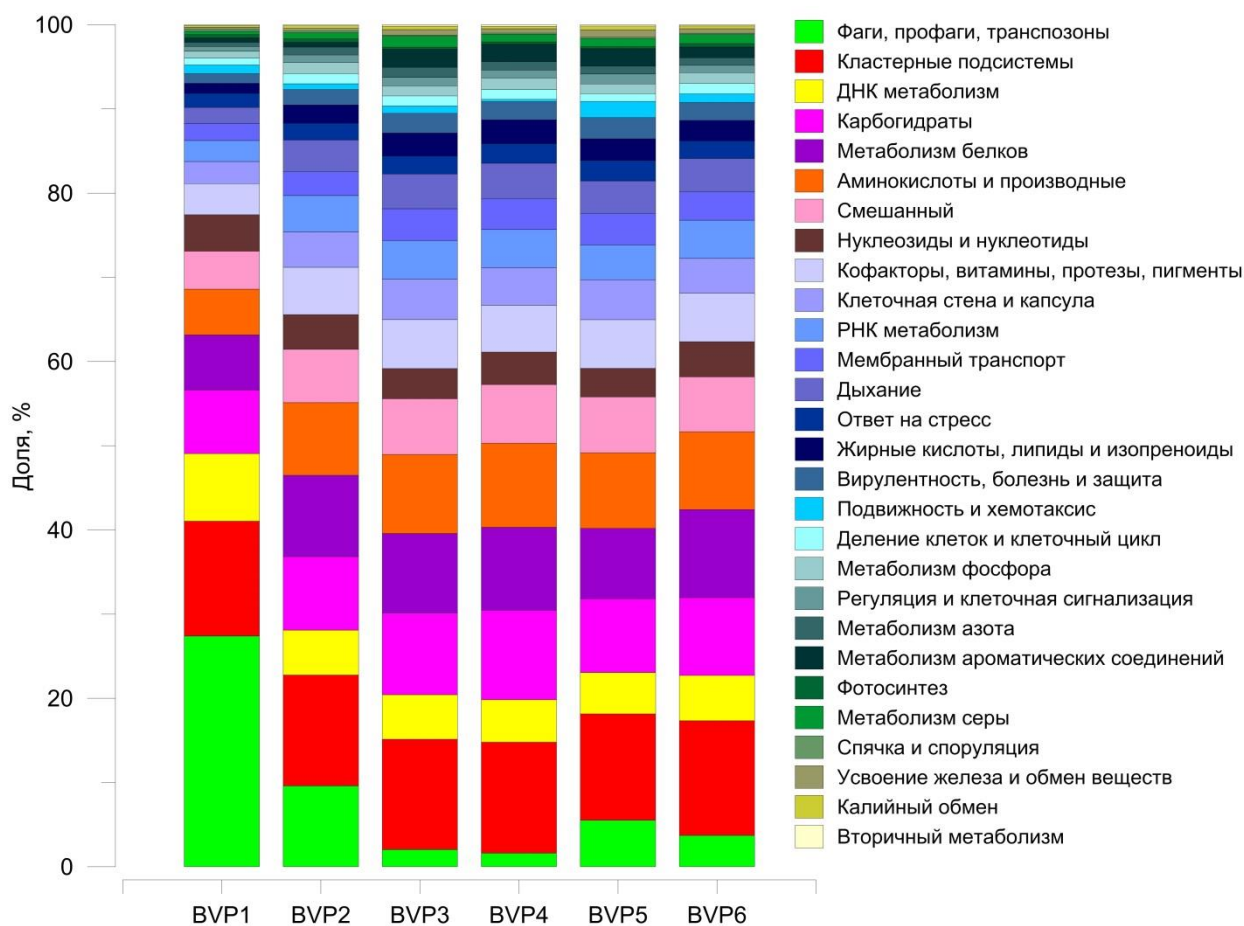


Рисунок 20 – Функциональная аннотация виромов с использованием базы данных SEED Subsystems (MG-RAST)

## 6.5 Анализ скаффолдов

Из скаффолдов, собранных SPAdes, были отсортированы с помощью программы VIBRANT v.1.2.1. (Kieft, Zhou, Anantharaman, 2019), скаффолды, принадлежащие вирусам (минимальная длина – 5000 нк, минимальное количество ORF – 4). Далее скаффолды были аннотированы (blastn), используя базу данных RefSeq 2019 и GenBank 2019. По базе данных RefSeq

в виромах не идентифицируется от 41% до 53% скаффолдов, по базе данных GenBank – от 25,2% до 35,5%.

Наибольшее количество вирусных скаффолдов определено в пробе BVP5 (Малое море) (рис. 21).

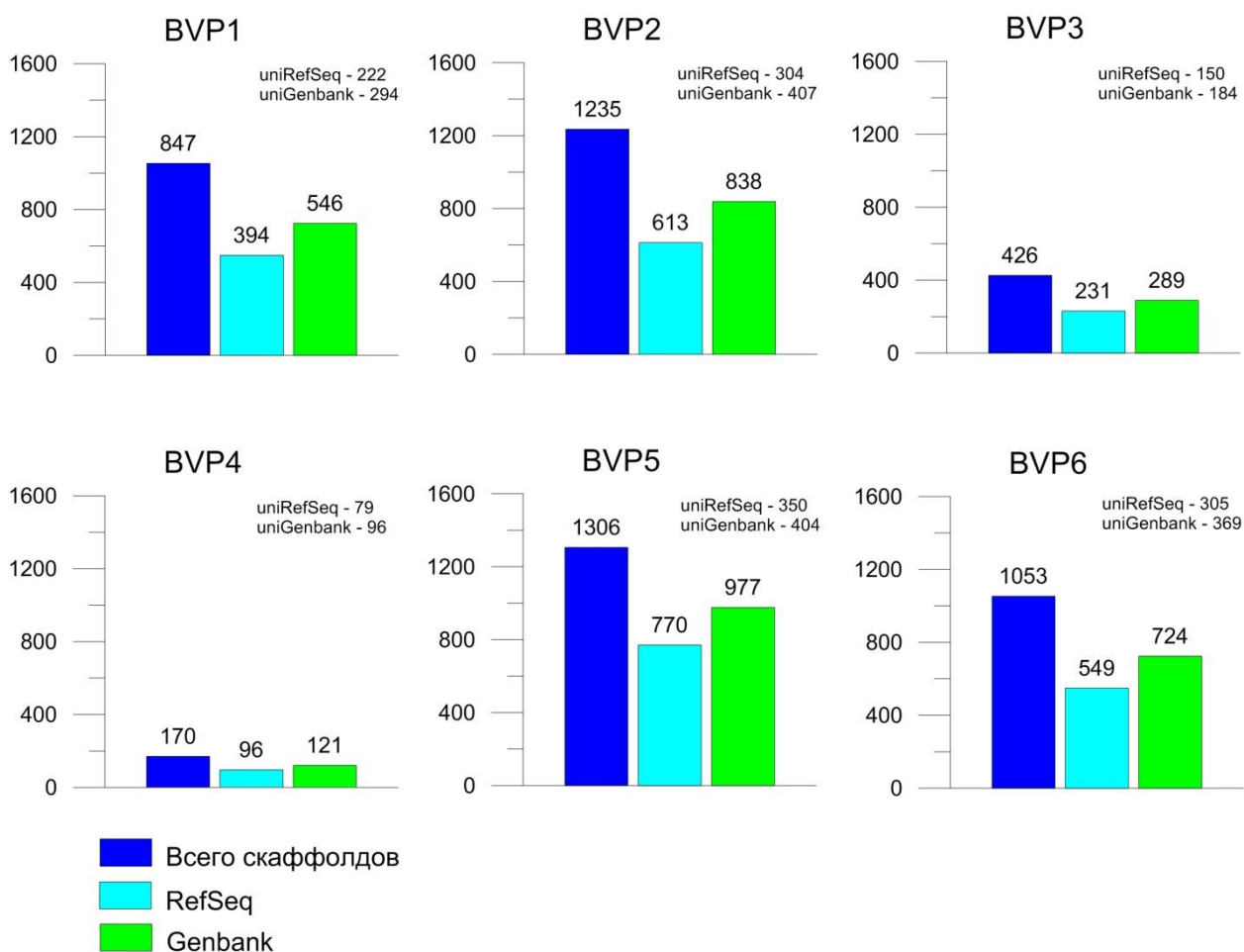


Рисунок 21 – Общее количество скаффолдов, определённых как вирусные, и количество совпадений с референсными последовательностями из баз RefSeq и Genbank. uniRefSeq и uniGenbank – количество уникальных записей из аннотированных по RefSeq и Genbank, соответственно (т.е. принадлежащих одному виду)

Сходство с референсными последовательностями по базе данных RefSeq (e-value  $10^{-3}$ ) варьировало: BVP1 – 63-94,4%, BVP2 – 63,4-100%, BVP3 – 64,6-93,9%, BVP4 – 65,9-92,1%, BVP5 – 63,6-97,1%, BVP6 – 63,1-96,9%, покрытие составляло от 0 до 100%. Следует отметить, что 0 – это не абсолютное значение, вероятно за этой цифрой скрывается 0,1-0,9%, однако программа

выдаёт только целые значения, 100% покрытие имели скаффолды, принадлежащие *Staphylococcus* фагу. Неклассифицированные скаффолды стоит вычислять как скаффолдов «всего» минус классифицированные по базам данных.

Согласно GenBank, основную часть аннотированных белков составляли гипотетические белки (72,2-81%), также многочисленны были большая субъединица терминазы, малая субъединица терминазы, основной капсидный белок, минорный капсидный белок, белок хвоста.

В каждой из сборок (BVP1 - BVP6) кольцевые полногеномные последовательности, определённые VIBRANT, имели небольшое покрытие (0-32%) с референсными последовательностями культивированных вирусов из базы данных NCBI NR/NT (blastn, evaluate  $10^{-3}$ ). К тому же в тех из них, где присутствовала аннотированная терминаза (большая субъединица) сходство по blastp-анализу составило от 24% до 75%, покрытие от 32% до 99%, т.е в базе данных нет похожих записей.

Количество собранных скаффолдов, полногеномных кольцевых последовательностей, доминирующие хиты (blastn) представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Анализ скаффолдов, полученных из виромов оз. Байкал

Образец	Всего скаффолдов	Определены как вирусные	Доминирующий хит (refseq)	Кол-во скаффолдов, соответствующих домин. хиту	Полногеномные, кольцевые
BVP1	272422	847	Yellowstone Lake virophage 5 (NC_028269)	17	15
BVP2	396033	1235	<i>Synechococcus</i> phage S-SM2 (NC_015279)	22	18
BVP3	211148	426	Yellowstone Lake virophage 5 (NC_028269)	12	13
BVP4	179363	170	<i>Prochlorococcus</i> phage P-TIM68 (NC_028955)	5	3
BVP5	372398	1306	<i>Chrysochromulina ericina</i> virus isolate CeV-01B (NC_028094)	28	20
BVP6	284340	1053	<i>Synechococcus</i> phage S-CBS4 (NC_016766)	14	10

Из всех 79 кольцевых полногеномных последовательностей только 3 имели покрытие с референсной последовательностью более 18% (GenBank).

Генетическая карта скаффолда Node\_88 представлена на рисунке 22, он выбран как последовательность, которая имела большее количество аннотированных кодирующих последовательностей (coding sequences, CDS). Скаффолд Node\_88 получен из сборки *de novo* виroma BVP2, покрытие ридами составило 16,5, длина – 42155 нуклеотидов. Скаффолд определяется программой VIBRANT как кольцевой полный геном, характеризуется лизогенным типом инфекции. Последовательность имеет 47 открытых рамок считывания, из них 25 аннотируются по базе данных NCBI NR (2020 г.) с помощью blastp (e-value  $10^{-3}$ ), остальные являются гипотетическими. Среди идентифицированных продуктов найдены большая субъединица терминазы, хвостовой трубчатый белок, белок капсида и белок, присоединяющий капсид к хвостовому отростку. Ближайшим родственником большой субъединицы терминазы байкальского фага является *Ralstonia* фаг P-PSG-11 (сходство 73%, покрытие 95%), основной капсидный белок сходен с *Ralstonia* фаг P-PSG-11 (сходство 61%, покрытие 100%). Возможно, этот гипотетический геном принадлежит фагу сем. *Podoviridae*. Из-за большого разнообразия бактериофагов в окружающей среде и ограниченного количества вирусных геномов, доступных в базах данных, невозможно с большим процентом сходства идентифицировать до вида большинство вирусов, полученных в сборках *de novo*, в частности скаффолд Node\_88.

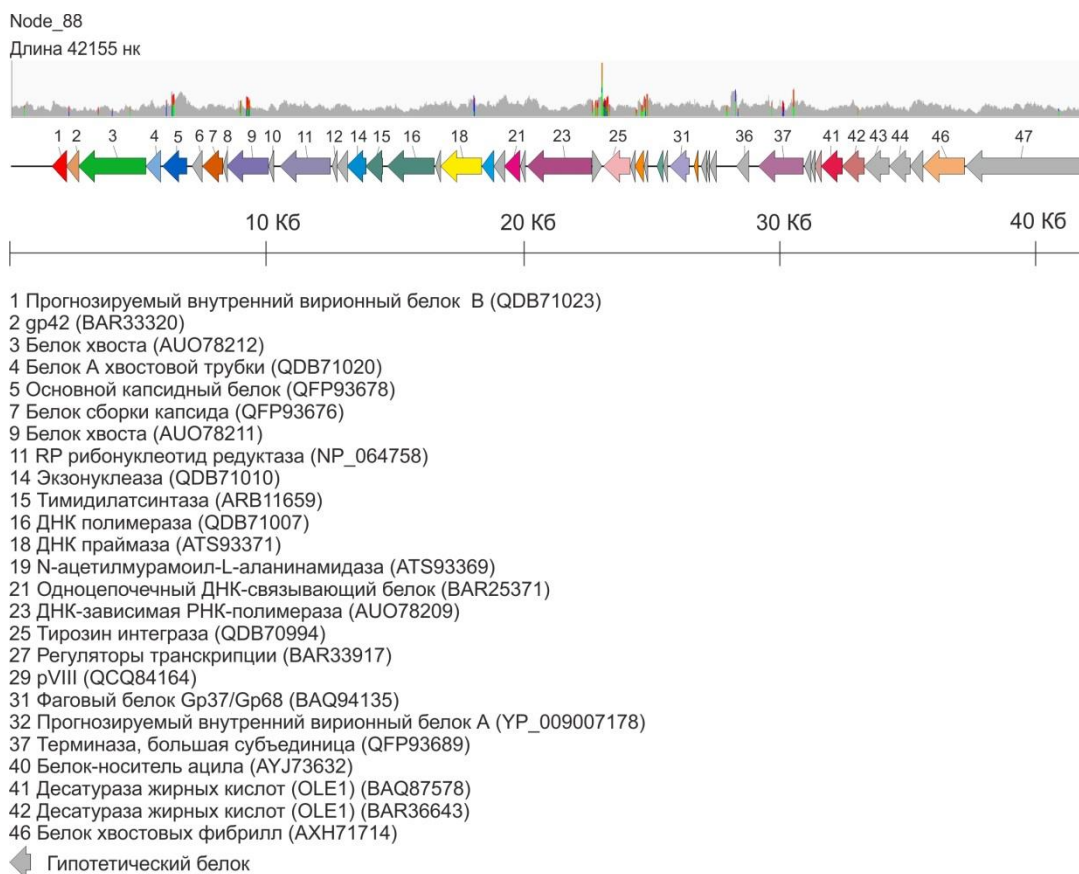


Рисунок 22 – Карта предполагаемых генов скаффолда Node\_88.

Гистограмма отображает покрытие (IGV)

Скаффолд Node\_164 (BVP5) имел 60 CDS и длину 37496 нк, он определён как литический. Его ближайший родственник – *Methylophilaceae* фаг P19250A (покрытие – 32%, сходство – 68%) – поражает пресноводную бактерию семейства *Methylophilaceae* IMCC19250 (клада LD28). *Methylophilaceae* фаг P19250A семейства *Siphoviridae* выделен из озера Соянг (Южная Корея).

Node\_33 (BVP5) характеризуется длиной 77585 нк и 122 CDS, относится к литическому типу. Ближайшим родственником является *Synechococcus* фаг S-CBS4 (покрытие – 21%, сходство – 67,8%), причём совпадение по покрытию было фрагментарным, что ещё раз может служить подтверждением гипотезы о коровых генах этих фагов. Референсный фаг принадлежит сем. *Siphoviridae*, он изолирован на культуре морского *Synechococcus* sp. CB0101.

Среди линейных последовательностей скаффолдов, которые не были собраны полностью, сходство и покрытие с референсными последовательностями из базы GenBank колебалось в широких пределах.

В собранных скаффолдах из каждого вирома обнаружено от 41 до 270 вспомогательных метаболических генов (Auxiliary metabolic genes, AMGs). Анализ показал, что основную долю в виромах BVP2, BVP4, BVP5, BVP6 составляют категория «углеводы», в виромах BVP1 и BVP3 «аминокислоты». В скаффолдах были обнаружены такие AMG гены как *DNMT1* (метилирование ДНК), *DNMT3A* (метилирование ДНК), *vanY* (участвует в биосинтезе и метаболизме клеточной стенки бактерий), *cobS* (процесс биосинтеза кобаламина), *ahbD* (каталитическая активность, связывание ионов металлов), *psbA* (кодирует белок D1 реакционного центра ФСII), *psbD* (кодирует белок D2 реакционного центра ФСII), *purC* (процесс биосинтеза кобаламина), *speT* (белок-фикоцианобилиновая связь) и др. AMGs-гены модулируют метаболизм клеток-хозяев во время инфекции, благодаря чему фаг может реплицироваться более эффективно. Что указывает на контроль транскрипции фагами в хозяйской клетке путём отключения и/или включения генов, необходимых для успешной репликации вирусных частиц.

В каждой из сборок обнаружены CRISPR системы: BVP1 – 45, BVP2 – 55, BVP3 – 33, BVP4 – 30, BVP5 – 72, BVP6 – 69 и *Cas* гены: BVP1 – 29, BVP2 – 89, BVP3 – 48, BVP4 – 102, BVP5 – 105, BVP6 – 86. В анализ были отобраны скаффолды, имеющие минимальную длину 5000 п.н. Самое большое количество спейсеров (51) обнаружено в скаффолде (длина 7990 нк) из BVP2, который по бласт-анализу (на нуклеотидном уровне) был ближе всего к *Rhodospirillum rubrum* DSM 24876 (покрытие – 95%, идентичность – 72%).

## 6.6 Сравнительный анализ виромов

Дендрограмма, построенная с использованием агломерационной иерархической кластеризации, демонстрирует чёткое разделение виромов на



Бива, считается мезотрофным) (<https://www.biwahaku.jp/english/facts/index.html>). До настоящего времени трофический статус оз. Байкал по гидрохимическим параметрам остается олиготрофным (Khodzher et al., 2017), однако признаки эвтрофирования регистрируются в прибрежной зоне озера вблизи поселков и туристско-рекреационных зон (Khodzher et al., 2018). Наблюдаемая кластеризация вирома из литоральной зоны оз. Байкал и оз. Бива также говорит об эвтрофировании литоральной зоны вблизи пос. Б.Коты, как показано ранее в работе (Timoshkin, 2018).

Основные характеристики озёр представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика озёр, виromы из которых взяты для кластерного анализа

Озеро	Трофический статус	Средняя и максимальная глубина, м	Площадь, км <sup>2</sup>	Страна	Дата отбора проб	Ссылка
Мичиган	олиготрофное	279 (281)	58030	США	06.13 07.13	(Watkins et al., 2015)
Байкал*	олиготрофное с признаками мезотрофии	744,7 (1637)	31722	Россия	11.13 <b>03.18</b> <b>06.18</b> <b>08.18</b> <b>09.18</b>	(Butina et al., 2019b; Potapov et al., 2019)
Эри	мезотрофное	19 (64)	25700	США, Канада	07.13	(Mohiuddin, Schellhorn, 2015)
Онтарио	олиго-мезотрофное	86 (244)	19500	США, Канада	06.13	
Лох-Ней	эвтрофное	9 (31)	392	Сев. Ирландия	04.14	(Skvortsov et al., 2016)
Бива*	эвтрофное	41 (103,8)	670,3	Япония	07.16	(Okazaki et al., 2019)

\* отмечены древние по происхождению озера

Согласно проведенному анализу, наблюдается разделение байкальских виромов по сезонам: подлёдное сообщество BVP1 имеет отдельную ветвь в

кластере, позневесенние сообщества из трех котловин озера (BVP2, BVP3, BVP4) формируют общий подкластер, виromы BVP5 и BVP6 образуют так же отдельный «летний» подкластер (август и сентябрь, соответственно).

Как отмечено выше, на дендрограмме виromы оз. Байкал располагаются ближе всего к виromам других крупнейших по площади озер Земли: Онтарио, Эри, Мичиган, образуя совместную кладу, названную нами «кладой крупнейших озер» (Potapov et al., 2019). Озера Мичиган, Эри и Онтарио входят в систему Великих американских озер, они расположены в умеренном климатическом поясе. Ранее озеро Мичиган характеризовалось как мезотрофное, теперь его трофический статус определен как олиготрофный (Mida et al., 2010). Озеро Эри является мезотрофным, озеро Онтарио – олиго-мезотрофным. Таким образом, очевидно, что объединение виromов в кластер происходит на основе нескольких признаков, таких как морфометрия (размер), географическое положение (зона умеренных широт), трофический статус (олиго- и мезотрофный), что определяет состав и структуру вирусных сообществ, которые, в свою очередь, являются отражением разнообразия и обилия других компонентов планктона озер.

Доминирующими представителями весенних планктонных сообществ Великих американских озер являются центрические диатомовые водоросли, прежде всего, представители родов *Aulacoseira* и *Stephanodiscus*. Ранее подо льдом в оз. Байкал доминировал комплекс эндемичных диатомовых водорослей, состоящий преимущественно из *Aulacoseira baicalensis* и *Stephanodiscus meyeri*, однако начиная с 2007 г. в байкальском фитопланктоне наблюдается смена сообществ диатомовых водорослей. В весеннем планктоне озера стала преобладать мелкая диатомовая водоросль *Fragilaria radians*=*Synedra acus* с тонким кремнистым панцирем (Bondarenko et al., 2019). Сходно с Байкалом, большинство вирусов в виromах озера Мичиган, принадлежало порядку Caudovirales, внутри которого преобладали семейства *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* (27%, 23%, 9%, соответственно, от общего количества известных вирусных

последовательностей). В виромах озёр Эри и Онтарио также были наиболее многочисленны фаги семейства *Myoviridae* (79,7%), вторым и третьим преобладающими семействами были *Podoviridae* (7,9%) и *Siphoviridae* (4,5%). В то же время наиболее представленными были вирусы, поражающие водоросли (семейство *Phycodnaviridae* – 4,3%), насекомых и животных (семейство *Iridoviridae* – 2,6%). Следует отметить, что виромы из озёр Онтарио, Эри и Мичиган отобраны в прибрежной зоне из поверхностного слоя воды (0-5 м), в нашем случае мы получили виром из слоя 0-50 м в пелагиали озера, тем не менее, они оказались сходными и сформировали совместный кластер.

В соседнюю «эвтрофную» кладу вошли виромы, отобранные из эвтрофных водоемов: реки Хан (Южная Корея) и озера Лох-Ней (Ирландия). В реке Хан летом наблюдается «цветение воды», вызванное цианобактерией *Anabaena* (Li et al., 2013).

Наиболее удаленное положение на дендрограмме занимал виром из мангровых почв (Китай). В этом образце доминировали вирусы семейства *Circoviridae* (39%) и *Microviridae* (38%), представители порядка *Caudovirales* занимали второе место в вирусной фракции (21%) (Jin et al., 2019). Почвенные виромы, отобранные на севере Швеции характеризовались только 15% сходства с базой данных RefSeq (Trubl et al., 2018). Морские виромы значительно отличаются от вирусных сообществ почв и пресных водоёмов, разделяясь, в свою очередь, на отдельные кластеры.

## **6.7 Анализ массивов многомерных данных физико-химических и микробиологических показателей**

Для анализа биотических и абиотических факторов, влияющих на функционирование биомов экосистемы оз. Байкал был создан массив данных по 6 образцам виромов. Для корреляционного анализа использовали следующие показатели: температура, рН, содержание хлорофилла *a*, общего фосфора, общего азота, общего углерода, нитритов, нитратов, аммонийного

азота, кремния, фосфатов, кислорода, численность бактерий и вирусных частиц, индекс разнообразия по Шеннону (на основе k-mers 3). В итоге для анализа был подготовлен массив данных размерностью 6 строк и 15 столбцов.

Как следует из проведенного корреляционного анализа, между численностью вирусных частиц и бактерий, индексом разнообразия по Шеннону, температурой наблюдается положительная корреляционная связь (рис. 24).

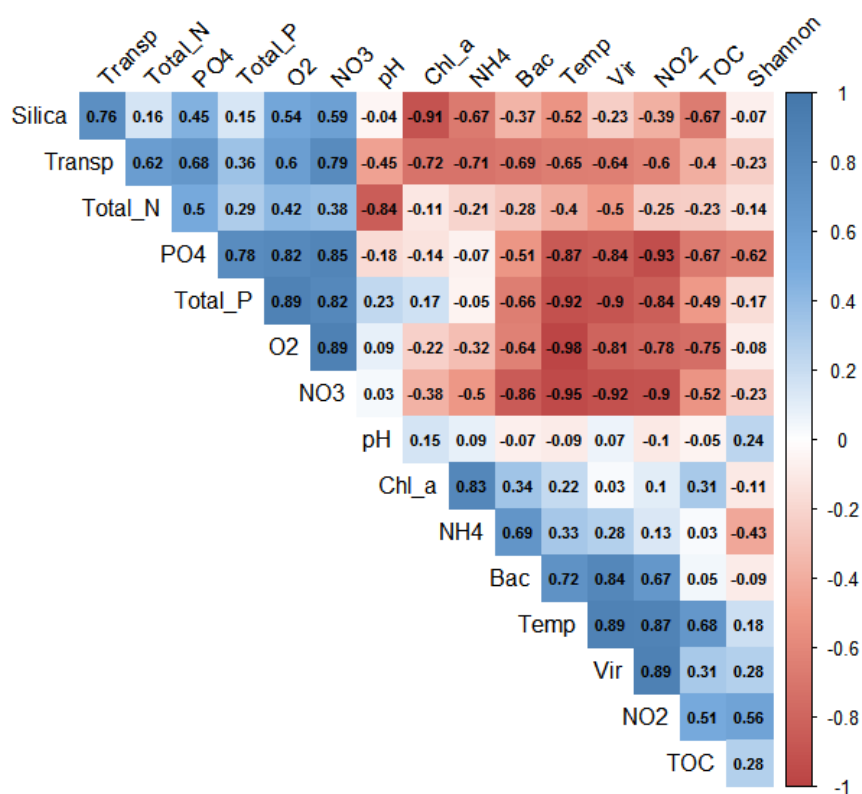


Рисунок 24 – Корреляционная диаграмма, построенная по физико-химическим и биотическим параметрам

Коэффициенты корреляции составили: между численностью вирусных частиц и численностью бактерий  $r=0,84$  ( $p<0,05$ ), между численностью вирусов и температурой  $r=0,89$  ( $p<0,05$ ).

Температура может быть важным фактором регуляции численности ВЧ (Maranger, Bird, 1995), т.к. влияет на скорость роста бактерий и имеет значительный положительный эффект на бактериальную продукцию (White

et al., 1991). Повышение температуры стимулирует развитие фитопланктона, усиливается его фотосинтетическая деятельность и водоем обогащается растворенным органическим веществом, доступность которого приводит к возрастанию численности бактерий (Кузнецов, Саралов, Назина, 1985).

Как известно, бактериальный планктон обеспечивает активное размножение фагов, только если он сам находится в состоянии активного роста и продукции (Hara et al., 1996; Maranger, Bird, Juniper, 1994).

Аммонийный азот находится в прямой зависимости от хлорофилла *a*, т.к. в водах озера он образуется при разложении азотсодержащего органического вещества.

Отмечено увеличение значений нитритов в августе, которые являются промежуточным продуктом минерализации. Нитритный азот – один из индикаторов загрязнения, в байкальской воде образуется в небольших количествах (ниже 1 мкг N/л) при отмирании и разложении фитопланктона, либо поступает с берега с талыми водами и со склоновым дождевым стоком (Голобокова, 2010; Томберг, Сороковинова, Башенхаева, 2012).

Общий фосфор и фосфаты имеют положительную корреляцию ( $r=0,78$ ,  $p < 0,05$ ), достигая максимальных значений в марте в 7 км от пос. Листвянка (подлёд) 13 мкг/л и 0,03 мг/л, соответственно.

Уровень pH является ключевым фактором при определении инфекционности вируса, было обнаружено, что низкий pH ( $pH < 4$ ) значительно снижает выживаемость фага (70-100%) (Jurczak-Kurek et al., 2016).

Для анализа NMDS и определения взаимосвязи состава и структуры виромов с физико-химическими и биологическими параметрами использованы 18 вирусных сообществ и 10 параметров, таких как температура, общий азот, общий фосфор, кремний, фосфаты, хлорофилл *a*, кислород, pH, разнообразие по Шеннону, численность вирусов (рис. 25). Анализ демонстрирует чёткое разделение на группы по трофности экосистем (обведены овалами). С виромами из озера Байкал, Онтарио, Эри и Мичиган

позитивно ассоциированы концентрация кислорода, рН, численность вирусов и индекс разнообразия по Шеннону. С эвтрофными озёрами Лох-Ней, Матока связаны концентрация  $PO_4^{3-}$  и хлорофилла *a*. Реки положительно ассоциированы с кремнием, общим фосфором и температурой. Виromы из р. Амазонка, её притока Тапажос и р. Пара также находятся на значительном удалении от остальных виromов, что обусловлено их таксономическим составом: в этих образцах преобладали вирусы эукариот (Silva et al., 2017).

Все показатели имеют уровень значимости  $p < 0,01$ .

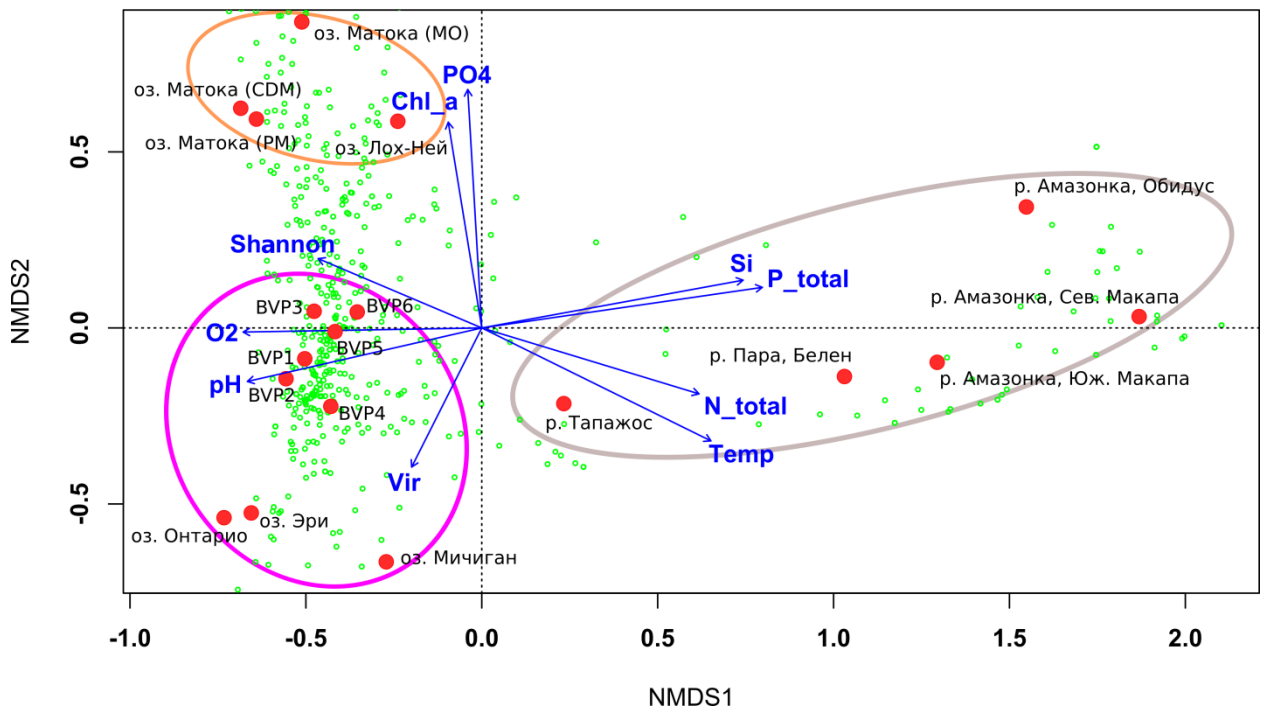


Рисунок 25 – NMDS-анализ, проведённый на основе таксономии виromов, физико-химических и биотических параметров. Temp – температура, N\_total – общий азот, P\_total – общий фосфор, Si – кремний,  $PO_4$  – фосфаты, Chl\_a – хлорофилл *a*, Shannon – индекс разнообразия по Шеннону,  $O_2$  – растворённый кислород, pH – показатель pH, Vir – численность вирусных частиц

Таким образом, в результате анализа виromов показано, что байкальские виromы отличаются от всех известных, что связано в первую очередь с

географической обособленностью озера, уникальностью его гидрофизических и гидрохимических параметров, высоким эндемизмом его сообществ. Вирусное разнообразие по индексу Шеннона (на основе k-mers), исходя из анализа, зависит от продуктивности местообитания сообществ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты численности вирусных частиц, с помощью ЭФМ и ПЦ показали высокую сходимость двух методов ( $r=0,97$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ ). Численность вирусов значительно изменялась по глубинам в исследуемый период в южной котловине озера: в поверхностном слое воды обнаружено  $3,5\text{--}4,9 \times 10^6$  ВЧ /мл, с глубиной в эвфотическом слое численность ВЧ увеличивалась, максимальные значения выявлены на 5-15 м ( $4,7\text{--}8,3 \times 10^6$  ВЧ /мл), начиная с 25 м происходит снижение численности в несколько раз, до  $2,2\text{--}3,6 \times 10^6$  ВЧ /мл. На глубинах 400-800 м количество вирусов снижалось до  $0,3\text{--}0,7 \times 10^6$  ВЧ /мл, в придонных областях 1000-1200 м наблюдали небольшое увеличение концентрации до  $0,6\text{--}1,4 \times 10^6$  ВЧ /мл (данные приведены по результатам ПЦ).

Численность вирусных частиц в эвфотическом слое воды входила в диапазон показателей численности, выявленных в других озерах сходного трофического уровня и ранее в оз. Байкал, методом ТЭМ. Численность бактериопланктона, впервые установленная в оз. Байкал методом ПЦ, достигала  $3,3\text{--}4,4 \times 10^6$  кл/мл, данные ПЦ также имели высокий коэффициент корреляции с результатами ЭФМ.

Обнаружена прямая корреляция между численностью вирусных частиц и гетеротрофных бактерий ( $r = 0,93\text{--}0,98$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ ), ВЧ и ПЦБ ( $r = 0,8\text{--}0,95$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ ). Полученные результаты показали бóльшую зависимость количества ВЧ от численности гетеротрофных бактерий, чем ВЧ от пикоцианобактерий. Выявлено, что численность вирусных частиц положительно коррелировала с концентрацией хлорофилла *a* ( $r = 0,71\text{--}0,91$ ), указывая на то, что массовое развитие планктонных водорослей и автотрофного пикопланктона может приводить к увеличению концентрации вирусов (цианофагов и альговирусов). Установлен положительный коэффициент корреляции между численностью вирусных частиц и температурой ( $r = 0,56\text{--}0,91$ ,  $p\text{-value} < 0,05$ ). Таким образом, можно говорить о том, что повышение продуктивности фотоавтотрофных микроорганизмов и

температуры воды способствуют увеличению численности вирусов. В свою очередь, рост концентрации вирусов должен приводить к гибели клеток фито- и бактериопланктона, увеличению роли «вирусного шунта» в экосистеме озера и изменению всех компонентов трофической цепи.

Исследования годовой динамики численности вирусных частиц в пелагиали южной котловины в период 2011-2016 гг. показали, что количество ВЧ в течение шести лет изменялось в 9 раз в эуфотическом слое. Максимальная численность ВЧ в сезонном аспекте отмечена в сентябре, минимальная в июне, в сезонном аспекте численность варьировала в 4-5 раз. Бактерии и ПЦБ были наиболее обильными в эпилимнионе озера в осенний период. Высокой продуктивностью в отношении ВЧ отличался 2015 г., низкой – 2011, 2013 гг., тогда как 2012, 2014, 2016 годы явились среднепродуктивными и сходными по количеству ВЧ. Среднегодовая численность ВЧ в сентябре 2011-2016 гг. составила  $3,79 \pm 0,9 \times 10^6$  ВЧ/мл. За годы наблюдений обнаружены тренды повышения численности ВЧ, бактерий и ПЦБ. В целом соотношения вирусы/бактерии соответствовали таковым в других олиготрофных озёрах.

Впервые получены нуклеотидные последовательности Т4-подобных бактериофагов из биопленок, сформированных на абиотических и биотических субстратах в прибрежной зоне оз. Байкал, и из поверхностного микрослоя озера. Проведенный анализ продемонстрировал высокое разнообразие Т4-подобных бактериофагов в оз. Байкал. Показано, что сообщество Т4-подобных бактериофагов из биопленок и тел губок имеет наибольшее сходство с планктонными последовательностями бактериофагов, что обусловлено фильтрационным типом питания этих животных. Сообщества бактериофагов из биопленок камней и губок из прибрежной зоны оз. Байкал близки последовательностям, полученным из водной толщи пелагиали озера, они формируют общий «байкальский» кластер. Бактериофаги поверхностного микрослоя из прол. Малое Море имеют заметное отличие от других экотопов оз. Байкал, они группируются в один

кластер с последовательностями из полярных озер, образуя совместную кладу с «байкальским» кластером. В целом, полученные данные демонстрируют наиболее близкое родство вирусных сообществ различных экотопов оз. Байкал и меньшее сходство с другими экосистемами, что может определяться, как физико-химическими параметрами среды обитания, так и зависеть от происхождения оз. Байкал, времени его образования и географической обособленности.

Множество работ по исследованию биоразнообразия вирусов в морских и пресноводных экосистемах, появившихся в последнее время, в той или иной мере предполагают их анализ с точки зрения биогеографии. Понимание временного и пространственного распределения природных бактериофагов имеет большое значение для прогнозирования их влияния на популяции клеток-хозяев, на структуру микробного сообщества и, следовательно, на крупномасштабные биосферные процессы. Вирусное сообщество Байкала, как показали наши данные, следует рассматривать в свете одной из четырех моделей биогеографического распределения их хозяев – бактерий, согласно которой состав бактериальных сообществ определяется ограничением их распространения и условиями окружающей среды. Основанием для этого служит длительная история формирования озера и его биоты в течение многих миллионов лет относительной изоляции, в условиях низких температур, малого содержания органического вещества и биогенов, больших глубин и размеров. Для эндемичных байкальских рыб и губок показана относительно недавняя дивергенция видов от общего предка и малые генетические дистанции между видами (Kontula, Kirilchik, Väinölä, 2003; Schroder et al., 2003).

Ранее с использованием таргетного секвенирования по Сенгеру было предположено, что некоторые вирусы являются космополитами и поражают аналогичные виды хозяев, а часть их обладает уникальным происхождением (Breitbart, Miyake, Rohwer, 2004; Short, Suttle, 2005). В настоящее время с внедрением в практику изучения микробных сообществ метода

высокопроизводительного секвенирования появилась возможность получать большие массивы геномных данных и достоверно сравнивать различные микробиомы и виромы.

Впервые проведено исследование структуры сообщества T4-подобных бактериофагов в планктоне оз. Байкал на основе высокопроизводительного секвенирования гена основного капсидного белка *g23*. Получено более 33 тыс. последовательностей гена капсидного белка *g23*, свидетельствующих о высоком разнообразии T4-подобных бактериофагов в озере. Проведенный анализ показал эффективность данного подхода, и в дальнейшем планируется продолжить исследование для выявления наиболее полного разнообразия этой группы вирусов и их роли в экосистеме озера. Пополнение баз данных по гену капсидного белка *g23* из разных водоемов, полученных с помощью высокопроизводительного секвенирования, даст возможность проанализировать распространение этой группы вирусов в глобальном масштабе.

На примере оз. Байкал впервые для древних озер Земли определено генетическое разнообразие двухцепочечных ДНК-содержащих вирусных сообществ. Показаны состав и структура виромов водной толщи оз. Байкал методами высокопроизводительного секвенирования и биоинформатического анализа. Всего идентифицировано 21 семейство вирусов. В виrome доминируют хвостатые бактериофаги порядка *Caudovirales*, среди них преобладает сем. *Myoviridae*. Среди вирусов из других порядков многочисленными были вирусы водорослей (*Phycodnaviridae*) и животных, включая человека (*Poxviridae*). Наиболее представительными родами были литические T4- и SPO1-подобные фаги, поражающие широкий круг бактерий, включая патогенные и условно-патогенные. Принимая во внимание значительное количество потенциально опасных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в районах с высокой антропогенной нагрузкой, значение литических бактериофагов, способных регулировать численность бактерий, для озера велико.

Собран скаффолд длиной 42 тыс. пар нуклеотидов, предположительно принадлежащий фагу *Ralstonia* P-PSG-11 (*Podoviridae*).

Сравнительный анализ вирусных сообществ оз. Байкал и других экосистем выявил, что виромы распределяются по основным экотопам: почвенные, морские и пресноводные, которые, в свою очередь, группируются в зависимости от морфометрии и продуктивности пресных водоемов. «Байкальские» виромы пелагиали всех трёх котловин озера образовали собственный кластер и сформировали совместно с виромами озёр Эри и Онтарио общую кладу «крупнейших озёр мира», отличающуюся низкой продуктивностью.

## ВЫВОДЫ

1. Численность вирусных частиц в верхних слоях воды пелагиали оз. Байкал по данным флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии в исследуемый период составила, в среднем,  $3,14 \pm 0,35$  млн. частиц/мл. Найдена значимая корреляционная связь между численностью вирусных частиц и бактерий; между количеством вирусных частиц и температурой воды в период положительной термальной стратификации.

2. Анализ сезонной и межгодовой динамики численности вирусных частиц выявил, что в период 2011-2016 гг. среднегодовое количество вирусных частиц изменялось в 9 раз, наименьшая численность ВЧ обнаружена в июне, наибольшая в сентябре. Максимальное количество вирусных частиц встречалось на глубине 5-15 м в течение всех исследованных сезонов (периоды положительной термальной стратификации вод и весенней гомотермии). В гипolimнионе обнаружены более высокие величины VBR, чем в эпилимнионе.

3. Сообщества Т4-подобных бактериофагов биоплёнок, сформированных на камнях и губках в литоральной зоне оз. Байкал, образуют с планктонными фагами пелагиали общий «байкальский» кластер. Фаги поверхностного микрослоя воды заметно отличаются от фагов «байкальского» кластера, при этом вирусные сообщества всех экотопов озера образуют общую кладу с полярными фагами.

4. Установлено высокое альфа-разнообразие планктонных Т4-подобных бактериофагов в пелагиали оз. Байкал. Анализ бета-разнообразия фаговых сообществ пресноводных и морских экосистем выявил уникальность Т4-подобных бактериофагов оз. Байкал.

5. В ДНК-содержащих виромах пелагиали оз. Байкал доминируют хвостатые бактериофаги (Caudovirales); из них сем. *Myoviridae* – 37,6-62,4%, *Siphoviridae* – 14,4-28,1%, *Podoviridae* – 9,3-25,5%. Всего идентифицировано 21 семейство вирусов. Наиболее многочисленным был род Т4-подобных литических фагов, среди которых преобладали цианофаги. Доля

неклассифицированных вирусных последовательностей в виромах составляла от 1,9 до 10,9%.

6. Сравнительный анализ вирусных сообществ почвенных, морских и пресноводных экосистем показал, что «байкальские» виромы образовали собственный кластер, в котором вирусные сообщества располагаются в зависимости от сезона и географической приуроченности. Виромы из озёр Байкал, Эри, Онтарио, Мичиган и Бива сформировали общую кладу «крупнейших и древнейших озёр мира», в которую входит подклада озёр, отличающихся низкой продуктивностью.

7. Методом NMDS установлено значимое влияние на состав виромов абиотических (температура, содержание биогенов) и биотических (численность вирусных частиц) факторов среды обитания.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бутина Т. В. Генетическое разнообразие цианофагов семейства Myoviridae в озере Байкал / Т. В. Бутина, С. А. Потапов, О. И. Белых, Н. Дамдинсүрэн, Б. Чойдаш // Известия ИГУ Серия «Биология. Экология». – 2012. – Т. 5. № 3. – С. 17–22.
2. Бутина Т. В. Генетическое разнообразие цианофагов семейства Myoviridae в составе сообщества байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* / Т. В. Бутина, С. А. Потапов, О. И. Белых, С. И. Беликов // Генетика. – 2015. – Т. 51. № 3. – С. 384–388.
3. Белых О. И., Беликов С. И. Выявление и учет вирусоподобных частиц в байкальской воде с помощью эпифлуоресцентной микроскопии / О. И. Белых, С. И. Беликов // Третья Верещагинская Байкальская конференция Тез. докл. Иркутск. – 2000.
4. Белькова Н. Л. Изучение состава водного бактериального сообщества озера Байкал методом гибридизации IN SITU / Н. Л. Белькова, В. В. Дрюккер, С. Х. Хонг, Т. С. Ан // Микробиология. – 2003. – Т. 72. № 2. – С. 282–283.
5. Бутина Т. В., Белых О.И., Беликов С.И. Молекулярно-генетическая идентификация T4 бактериофагов в озере Байкал / Т. В. Бутина, О. И. Белых, С. И. Беликов // ДАН. – 2010. – Т. 433. № 3. – С. 406–409.
6. Галачьянц А. Д. Численность бактерионейстона и физико-химические особенности поверхностного микрослоя озера Байкал / А. Д. Галачьянц, И. В. Томберг, Ю. Р. Штыкова, Е. В. Суханова, М. Ю. Сулова, Е. А. Зименс, В. В. Блинов, М. В. Сакирко, В. М. Домышева, О. И. Белых // Поволжский экологический журнал. – 2018. – Т. 4. – С. 379–390.
7. Голобокова Л. П. Гидрохимическая характеристика вод литорали северо-западного участка Южного Байкала // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна Т. 2: Водоёмы и водотоки юга Восточной Сибири и Северной Монголии, кн. 2. / под ред. О. А. Тимошкина, В. И. Провиз, Т. Я. Ситникова. : Новосибирск : Наука, 2010. С. 760–785.

8. Дроздов В. Н. Компьютерная система учета изображений флуоресцентно-окрашенных бактерий / В. Н. Дроздов, В. Н. Сергеева, С. Ю. Максименко, Т. И. Земская // Микробиология. – 2006. – Т. 75. № 6. – С. 751–754.
9. Дрюккер В. В. Размерная структура, сезонная динамика и вертикальное распределение бактериофагов / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова, А. С. Ковадло, Т. Я. Косторнова. // Известия ИГУ, Серия «Науки о Земле» – 2008. – Т. 1, № 1. – С. 189–197.
10. Дрюккер В. В. Поиск и исследование автохтонных бактериофагов в различных биотопах оз. Байкал / под ред. И. В. Бычков, А. Л. Казаков. г. Иркутск: Изд-ва Ин-та Географии, 2015. 120-124 с.
11. Дрюккер В. В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // ДАН. – 2006. – Т. 410. №6. – С. 847–849.
12. Дрюккер В. В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал / В. В. Дрюккер, Н. В. Дутова // ДАН. – 2009. – Т. 427. №2. – С. 277–281.
13. Дрюккер В. В. Коли-фаги озера Байкал и его притоков / В. В. Дрюккер, А. А. Масленников // Современные проблемы экологии, природопользования и ресурсосбережения Прибайкалья Матер. юбилейной конф. 22-23 сен. г. Иркутск: , 1998. С. 279.
14. Казаринова Т. Ф. и др. Оценка фильтрационной способности байкальских губок по поглощению микроорганизмов и одноклеточных водорослей // Оценка состояния водных и наземных экологических систем: Экологические проблемы Прибайкалья. Новосибирск: , 1994. Вып. Наука. С. 30–32.
15. Копылов А. И. Влияние вирусов на гетеротрофный бактериопланктон водохранилищ / А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов, Е. А. Заботкина // Микробиология. – 2011. – Т. 80. № 2. – С. 241–250.
16. Кузнецов С. И. Микробиологические процессы круговорота углерода и азота в озерах / С. И. Кузнецов, А. И. Саралов, Т. Н. Назина. – Москва: Наука, 1985. – 213 с.

17. Лозовик П. А. Аналитические, кинетические и расчетные методы в гидрохимической практике / П. А. Лозовик, А. В. Рыжаков, Г. С. Бородулина, Н. А. Ефременко, А. В. Сабылина, М. Б. Зобков, Д. О. Зайцев, С. А. Басова, М. В. Калмыков, Е. А. Перская, И. А. Степанова, Г. Л. Чесалина, И. С. Родькина, И. Ю. Кравченко, А. И. Птица, Н. Е. Галахина, М. В. Зобкова, О. И. Икко, Т. А. Ефремова, Н. В. Кулик, Н. А. Ефременко – СПб.: Нестор-История, 2017. – 272 с.
18. Максимов В. В. Микробиологическая характеристика открытых вод Байкала по данным общей численности микроорганизмов / В. В. Максимов, Е. В. Щетинина // Журнал СФУ. Биология. – 2009. – Т. 3. № 2009 2. – С. 263–270.
19. Максимова Э. А. Микробиология вод Байкала / Максимова Э. А., Максимов В. Н. // Иркутск: Иркут. ун-т, 1989. – 168 с.
20. Пиневиц А. В. Вирусология: учебник. / А. В. Пиневиц, А. К. Сироткин, О. В. Гаврилова, А. А. Потехин // Санкт–Петербург: , 2012. Вып. Изд-во Сан. – 432 с.
21. Потапов С. А. Применение метода проточной цитометрии для оценки численности бактерио- и вириопланктона в озере Байкал / С. А. Потапов, В. С. Муханов, И. В. Тихонова, О. И. Белых, С. С. Свинин // Питьевая вода в XXI веке.(Drinking Water in the XXI Century).Материалы научно-практической конференции с международным участием. Иркутск: Изд-во Института географии СО РАН, – 2013. – С. 57–58.
22. Тихоненко А. С. Ультраструктура вирусов бактерий / Тихоненко А. С. – Москва: Наука, 1968. – 90 с.
23. Томберг И. В. Динамика концентраций биогенных элементов и органических веществ на акватории авандельты реки Селенги / И. В. Томберг, Л. М. Сороковикова, Н. В. Башенхаева // Органическое вещество и биогенные элементы во внутренних водоемах и морских водах : материалы V Всерос. симпозиума с междунар. участием. – Петрозаводск: 2012. – С. 39–42.
24. Троицкая Е. С., Шимараев М. Н. Условная прозрачность и температура

- воды в Южном Байкале / Е. С. Троицкая, М. Н. Шимараев // Оптика атмосферы и океана. – 2005. – Т. 18. № 1–2. – С. 130–133.
25. Ackermann H. 5500 Phages examined in the electron microscope / H. Ackermann // Brief Review. – 2007a. – P. 227–243.
26. Ackermann H.-W. Bacteriophages: Tailed / H.-W. Ackermann // Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2007b.
27. Ackermann H.-W. The first phage electron micrographs / H.-W. Ackermann // Bacteriophage. – 2011. – V. 1. № 4. – P. 225–227.
28. Ackermann H.W. Tailed bacteriophages: the order caudovirales. / Ackermann H.W. // Adv. Virus Res. – 1998. – V. 51. – P. 135–201.
29. Afonso C. L. The Genome of Swinepox Virus / C. L. Afonso, E. R. Tulman, Z. Lu, L. Zsak, F. A. Osorio, C. Balinsky, G. F. Kutish, and D. L. Rock // J. Virol. – 2002. – V. 76. № 2. – P. 783–790.
30. Alexyuk M. S. Comparative study of viromes from freshwater samples of the Ile-Balkhash region of Kazakhstan captured through metagenomic analysis / M. Alexyuk, A. Turmagambetova, P. Alexyuk, A. Bogoyavlenskiy, V. Berezin // VirusDisease. – 2017. – V. 28. № 1. – P. 18–25.
31. Alonso M. C. Distribution of virus-like Particles in an Oligotrophic Marine Environment (Alboran Sea, Western Mediterranean) / M. C. Alonso, F. Jimenez-Gomez, J. Rodriguez, J. J. Borrego // Microb. Ecol. – 2001. – V. 42. № 3. – P. 407–415.
32. Andrewes C. H. Nomenclature of viruses / C. H. Andrewes // Nature. – 1954. – V. 173. – P. 260–261.
33. Andrewes C. H. A short description of the Myxovirus group (influenza and related viruses) / C. H. Andrewes, F. B. Bang., F. M. Burnet // Virology. – 1955. – V. 1. – P. 176–180.
34. Proposal and recommendations of the provisional committee for nomenclature of viruses (PCNV). : Ann Inst Pasteur, 1965. 625-637 pp.
35. Azam F. The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea / F. Azam, T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil, F. Thingstad // Mar. Ecol.

Prog. Ser – 1983. – V. 10. – P. 257–263.

36. Baltimore D. Expression of animal virus genomes. / D. Baltimore // *Bacteriol. Rev.* – 1971. – V. 35. № 3. – P. 235–241.

37. Bankevich A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham, A. D. Prjibelski, A. V. Pyshkin, A. V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M. A. Alekseyev, P. A. Pevzner // *J. Comput. Biol.* – 2012. – V. 19. № 5. – P. 455–477.

38. Barrangou R. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero, P. Horvath // *Science.* – 2007. – V. 315. № 5819. – P. 1709–1712.

39. Bawden F. C. Plant viruses and virus diseases / Bawden F. C. – Waltham, Massachusetts: Third Edn. Chronica Botanica Company, 1950. – 332 p.

40. Bellas C. M., Anesio A. M. High diversity and potential origins of T4-type bacteriophages on the surface of Arctic glaciers / C. M. Bellas, A. M. Anesio // *Extremophiles.* – 2013. – V. 17. № 5. – P. 861–870.

41. Belykh O. I. Light, electron and immuno-electron microscopy of organs from seals of Lake Baikal sampled during the morbillivirus infection of 1987-1988 / O. Belykh, O. Goldberg, Y. Likhoshway, M. Grachev // *Eur. J. Vet. Pathol.* – 1997. – V. 3. № 3. – P. 133–145.

42. Belykh O. I. Autotrophic picoplankton of Lake Baikal: Composition, abundance and structure / O. I. Belykh, G. Ekaterina, T. Sorokovikova, A. Saphonova, I. V. Tikhonova // *Hydrobiologia.* – 2006. – V. 568. № SUPPL. 1. – P. 9–17.

43. Belykh O. I. Presence and genetic diversity of microcystin-producing cyanobacteria (*Anabaena* and *Microcystis*) in Lake Kotokel (Russia, Lake Baikal Region) / O. I. Belykh, E. G. Sorokovikova, G. A. Fedorova, O. V. Kaluzhnaya, E. S. Korneva, M. V. Sakirko, T. A. Sherbakova // *Hydrobiologia.* – 2011. – V. 671. № 1. – P. 241–252.

44. Belykh O. I. Microcystin-producing cyanobacteria in biofilms from the littoral zone of Lake Baikal / O. I. Belykh, G. A. Fedorova, A. V. Kuzmin, I. V. Tikhonova, O. A. Timoshkin, E. G. Sorokovikova // *Bull. Moscow Univ. Ser. 16. Biol.* – 2017. – V. 72. № 4. – P. 262–269.
45. Belykh O. I., Sorokovikova E. G. Autotrophic Picoplankton in Lake Baikal: Abundance, Dynamics, and Distribution / O. I. Belykh, E. G. Sorokovikova // *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* – 2003. – V. 6. № September. – P. 251–261.
46. Benson D. A. GenBank / D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, D. L. Wheeler // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. № Database Issue. – P. 34–38.
47. Bergh O. High abundance of viruses found in aquatic environments / I. Bergh, K. Y. Børsheim, G. Bratbak, M. Heldal // *Nature.* – 1989. – V. 340. № 6233. – P. 467–8.
48. Berninger U. G. Heterotrophic flagellates of planktonic communities: their characteristics and methods of study / U. G. Berninger // *The biology of free-living heterotrophic flagellates* / ed. D. J. Patterson, J. Larsen. Oxford: Clarendon Press, 1991. – P. 39–56.
49. Bettarel Y. A Comparison of Methods for Counting Viruses in Aquatic Systems / Y. Bettarel, T. Sime-Ngando, C. Amblard, H. Laveran // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – V. 66. № 6. – P. 2283–2289.
50. Bettarel Y. Virioplankton and microbial communities in aquatic systems: A seasonal study in two lakes of differing trophicity / Y. Bettarel, T. Sime-Ngando, C. Amblard, J-F Carrias, C. Portelli // *Freshw. Biol.* – 2003. – V. 48. № 5. – P. 810–822.
51. Bettarel Y. Viral Activity in Two Contrasting Lake Ecosystems / Y. Bettarel, T. Sime-Ngando, C. Amblard, J. Dolan // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. № 5. – P. 2941–2951.
52. Bolger A. M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / A. M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. № 15. – P. 2114–2120.

53. Bondarenko N. A. Recent changes in the spring microplankton of Lake Baikal, Russia / N. A. Bondarenko, T. Ozerskyb, L. A. Obolkina, I. V. Tikhonova E. G. Sorokovikova, M. V. Sakirko, S. A. Potapov, V. V. Blinov, A. A. Zhdanov, O. I. Belykh // *Limnologica*. – 2019. – V. 75. – P. 19–29.
54. Bonilla-Findji O. Effect of seawater–freshwater cross-transplantations on viral dynamics and bacterial diversity and production / O. Bonilla-Findji, E. R. Newall, M. G. Weinbauer, M. D. Pizay, M. E. Kerros, J-P Gattuso // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2009. – V. 54. – P. 1–11.
55. Borriss M. Genome and proteome characterization of the psychrophilic *Flavobacterium* bacteriophage 11b / M. Borriss, T. Lombardot, F. O. Glöckner, D. Becher, D. Albrecht, T. Schweder // *Extremophiles*. – 2007. – V. 11. № 1. – P. 95–104.
56. Borsheim K. Y. Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy / K. Y. Borsheim, G. Bratbak, M. Heldal // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56. № 2. – P. 352–356.
57. Bouvier T. C., Giorgio P. A. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries / T. C. Bouvier, P. A. Giorgio // *Limnol. Oceanogr.* – 2002. – V. 47. № 2. – P. 453–470.
58. Bradley D. E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins / D. E. Bradley // *Bacteriol. Rev.* – 1967. – V. 31. № 4. – P. 230–314.
59. Brandes J. Classification of elongated plant viruses on the basis of particle morphology / J. Brandes, C. Wetter // *Virology*. – 1959. – V. 8. – P. 99–109.
60. Bratbak G. Viruses as Partners in Spring Bloom Microbial Trophodynamics / G. Bratbak, M. Heldal, S. Norland, T. F. Thingstad // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56. № 5. – P. 1400–1405.
61. Breitbart M. Genomic analysis of uncultured marine viral communities / M. Breitbart, P. Salamon, B. Andresen, J. M. Mahaffy, A. M. Segall, D. Mead, F. Azam, F. Rohwer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – V. 99. № 22. – P. 14250–5.
62. Breitbart M. Diversity and population structure of a near-shore marine-

- sediment viral community / M. Breitbart, B. Felts, S. Kelley, J. M. Mahaffy, J. Nulton, P. Salamon, F. Rohwer // *Proc. Biol. Sci.* – 2004. – V. 271. № 1539. – P. 565–574.
63. Breitbart M. Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences / M. Breitbart, J. H. Miyake, F. Rohwer // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – V. 236. № 2. – P. 249–256.
64. Breitbart M. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? / M. Breitbart, F. Rohwer // *Trends Microbiol.* – 2005. – V. 13. № 6. – P. 278–284.
65. Brosius J. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli* / J. Brosius, T. J. Dull, D. D. Sleeter, H. F. Noller // *J. Mol. Biol.* – 1981. – V. 148. № 2. – P. 107–127.
66. Brum J. R., Sullivan M. B. Rising to the challenge: Accelerated pace of discovery transforms marine virology / J. R. Brum, M. B. Sullivan // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – V. 13. № 3. – P. 147–159.
67. Brussaard C. P. D. Optimization of Procedures for Counting Viruses by Flow Cytometry / C. P. D. Brussaard // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70. № 3. – P. 1506–1513.
68. Brussaard C. P. D. Quantification of aquatic viruses by flow cytometry / C. Brussaard, J. P. Payet, C. Winter, M. Weinbauer // *Man. Aquat. viral Ecol.* – 2010. – V. 11. № 2004. – P. 102–109.
69. Burnet F. M. The classification of dysentery-Coli bacteriophages. III. A correlation of the serological classification with certain biochemical tests / F. M. Burnet // *J. Pathol. Bacteriol.* – 1933. – V. 37. № 2. – P. 179–184.
70. Butina T. V. Metagenomic analysis of viral communities in diseased Baikal sponge *Lubomirskia baikalensis* / T. V. Butina, Yu. S. Bukin, I. V. Khanaev, L. S. Kravtsova, O. O. Maikova, A. E. Tupikin, M. R. Kabilov, S. I. Belikov // *Limnology and fresh water biology* – 2019a. № 1. – P. 155–162.
71. Butina T. V. Estimate of the diversity of viral and bacterial assemblage in the coastal water of Lake Baikal / T. V. Butina, Y. S. Bukin, A. Yu. Krasnopeev, O. I. Belykh, A. E. Tupikin, M. R. Kabilov, M. V. Sakirko, S. I. Belikov // *FEMS*

Microbiol. Lett. – 2019b. – V. 366. № 9 – P. fnz094.

72. Butina T. V. Phylogenetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia / T. V. Butina, O. I. Belykh, S. Yu. Maksimenko, S. I. Belikov // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – V. 309. № 2. – P. 122–129.

73. Butina T. V. Genetic diversity of the family Myoviridae cyanophages in Lake Baikal / T. V. Butina, S. A. Potapov, O. I. Belykh, S. I. Belikov // Seriya Biologiya. Ekol. Izvestiya Irkutsk. Gos. Univ. – 2012. – V. 5. № 3. – P. 17–22.

74. Butina T. V. Molecular Genetic Study of T4-like Bacteriophages in Plankton of Selenga River / T. V. Butina, O. S. Usova, S. A. Potapov, O. I. Belykh, A. P. Fedotov, S. I. Belikov // Seriya Biologiya. Ekol. Izvestiya Irkutsk. Gos. Univ. – 2015a. – V. 12. – P. 12–22.

75. Butina T. V. Molecular genetic diversity of the Myoviridae family cyanophages in Lake Khövsgöl (Mongolia) / T. V. Butina, S. A. Potapov, O. I. Belykh, V. S. Mukhanov, O. A. Rylkova, N. Damdinsuren, B. Chojdash // Mol. Biol. – 2014. – V. 48. № 6. – P. 906–910.

76. Butina T. V. Genetic diversity of cyanophages of the myoviridae family as a constituent of the associated community of the Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* / T. V. Butina, S. A. Potapov, O. I. Belykh, S. I. Belikov // Russ. J. Genet. – 2015b. – P. 51. № 3. – P. 313–317.

77. Butina T. V. Diversity of the major capsid genes (g23) of T4-like bacteriophages in the eutrophic Lake Kotokel in East Siberia, Russia / T. V. Butina, O. I. Belykh, S. A. Potapov, E. G. Sorokovikova // Arch. Microbiol. – 2013. – V. 195. № 7. – P. 513–520.

78. Callieri C. Freshwater autotrophic picoplankton: a review / C. Callieri, J.G. Stockner // Journal of Limnology. – 2002. – V. 61. № 1. – P. 1–14.

79. Caporaso J. G. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing / J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. G. Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights // Nat. Publ. Gr. – 2010. – V. 7. № 5. – P. 335–

336.

80. Cárcer D. A. de Metagenomic analysis of lacustrine viral diversity along a latitudinal transect of the Antarctic Peninsula / D. A. de Cárcer, A. López-Bueno, J. M. Alonso-Lobo, A. Quesada , A. Alcamí // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2016. – V. 92. № 6. – P. 1–10.

81. Cárcer D. A. de Biodiversity and distribution of polar freshwater DNA viruses / D. A. de Cárcer, A. López-Bueno, D. A. Pearce, A. Alcamí // *Sci. Adv.* – 2015. – V. 1. № 5. – P. e1400127.

82. Cárcer D. A. de Composition and interactions among bacterial, microeukaryotic, and T4-like viral assemblages in lakes from both polar zones / D. A. de Cárcer, C. Pedrós-Alió, D. A. Pearce, A. Alcamí // *Front. Microbiol.* – 2016. – V. 7. № MAR. – P. 1–11.

83. Carrick H. J. The importance of zooplankton-protozoan trophic couplings in Lake Michigan / H. J. Carrick, G. L. Fahnenstiel, E. F. Stoermer, R. G. Wetzel // *Limnol. Oceanogr.* – 1991. – V. 36. № 7. – P. 1335–1345.

84. Castresana J. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis / J. Castresana // *Mol. Biol. Evol.* – 2000. – V. 17. № 4. – P. 540–552.

85. Chiura H. Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria // *Aquat. Microb. Ecol.* – 1997. – V. 13. № 1. – P. 75–83.

86. Chow C.-E. T. Biogeography of Viruses in the Sea / C.-E. T. Chow, C. A. Suttle // *Annu. Rev. Virol.* – 2015. – V. 2. № 1. – P. 41–66.

87. Clokie M. R. J. Virus isolation studies suggest short-term variations in abundance in natural cyanophage populations of the Indian Ocean / R. J. M. Clokie , A. D. Millard, J. Y. Mehta, N. H. Mann // *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom.* – 2006. – V. 86. № 3. – P. 499–505.

88. Cochlan W. P. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments / W. P. Cochlan, J. Wikner, G. F. Steward, D. C. Smith, F. Azam // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1993. – V. 92. – P. 77–87.

89. Cochran P. K. Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants / P. K. Cochran, C. A. Kellogg, J.H. Paul // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1998. – V. 164. – P. 125–133.
90. Cochran P. K. Seasonal Abundance of Lysogenic Bacteria in a Subtropical Estuary / P. K. Cochran, J. H. Paul // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64. № 6. – P. 2308–2312.
91. Cole J. J. Bacterial production in fresh and saltwater ecosystems: a cross-system overview / J. J. Cole, S. Findlay, M. L. Pace // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1988. – P. 1-10.
92. Comeau A. M. The capsid of the T4 phage superfamily: The evolution, diversity, and structure of some of the most prevalent proteins in the biosphere / A. M. Comeau, H. M. Krisch // *Mol. Biol. Evol.* – 2008. – V. 25. № 7. – P. 1321–1332.
93. Coombs D. H. Studies on the structure, protein composition and assembly of the neck of bacteriophage T4 / D. H. Coombs, F. A. Eiserling // *J. Mol. Biol.* – 1977. – V. 116. № 3. – P. 375–405.
94. D'Hérelle F. Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale) / F. D'Hérelle // *C.R. Soc. Biol.* – 1918. – V. 81. – P. 1160–1162.
95. Debroas D. Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget-France) / D. Debroas, J. - F.Humbert, F. Enault, G. Bronner, M. Faubladiet, E. Cornillot // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11. № 9. – P. 2412–2424.
96. Deng L. Evidence for cyanophages active against bloom-forming freshwater cyanobacteria / L. Deng, P. K. Hayes // *Freshw. Biol.* – 2008. – V. 53. № 6. – P. 1240–1252.
97. Desplats C. Phylogeny of the major head and tail genes of the wide-ranging T4-type bacteriophages / F. Tétart, C. Desplats, M. Kutateladze, C. Monod, H. W. Ackermann, H. M. Krisch // *J. Bacteriol.* – 2001. – V. 183. № 1. – P. 358–366.
98. Desplats C. The diversity and evolution of the T4-type bacteriophages / C.

- Desplats, H. M. Krisch // *Res. Microbiol.* – 2003. – V. 154. № 4. – P. 259–267.
99. Dinsdale E. Functional metagenomic profiling of nine biomes. / E. A. Dinsdale, R. A. Edwards, D. Hall, F. Angly, M. Breitbart, J. M. Brulc, M. Furlan, C. Desnues, M. Haynes, L. Li, L. McDaniel, M. A. Moran, K. E. Nelson, C. Nilsson, R. Olson, J. Paul, // *Nature.* – 2008. – V. 452. № 7187. – P. 629–632.
100. Djikeng A. Metagenomic Analysis of RNA Viruses in a Fresh Water Lake / A. Djikeng, R. Kuzmickas, N. G. Anderson, D. J. Spiro // *PLoS One.* – 2009. – V. 4. № 9. – P. 1–14.
101. Drake L. Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay / L. Drake, K. - H. Choi, A. Haskell, F. C. Dobbs, // *Aquat. Microb. Ecol.* – 1998. – V. 16. – P. 17–25.
102. Driel R. van Couture E. Assembly of the scaffolding core of bacteriophage T4 preheads / R. van Driel // *J. Mol. Biol.* – 1978. – V. 123, № 4. – P. 713–719.
103. Dutova N. V. Viral Community of Biofilms Forming on Different Substrates under Natural Conditions of Lake Baikal / N. V. Dutova, V. V. Drucker // *Dokl. Biol. Sci.* – 2013. – V. 451, № 4. – P. 238–240.
104. Efremova S. M. Lake Baikal: a unique place to study evolution of sponges and their stress response in an environment nearly unimpaired by anthropogenic perturbation / S. M. Efremova, V. B. Itskovich, V. Parfenova, V. V. Drucker, W. E. G. Müller, H. C. Schröder // *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* – 2002. – V. 48, № 4. – P. 359–371.
105. Eisenstark A. Bacteriophage techniques / A. Eisenstark – New York: Academic Press – 1967. – P. 449-525.
106. Falkowski P. G. Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea / P. G. Falkowski, A. D. Woodhead – Boston, MA : Springer, 1992. № JANUARY P. 550.
107. Fancello L. Viruses in the desert: a metagenomic survey of viral communities in four perennial ponds of the Mauritanian Sahara / L. Fancello, S. Trape, C. Robert, M. Boyer, N. Popgeorgiev, D. Raoult, C. Desnues // *ISME J.* – 2012. – V. 7. – P. 359–369.

108. Fenner F. A short description of the poxvirus group (vaccinia and related viruses) / F. Fenner, F. M. Burnet // *Virology*. – 1957. – V. 4. – P. 305–310.
109. Filée J. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere / J. Filée, F. Tétart, C. A. Suttle, H. M. Krisch // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – V. 102, № 35. – P. 12471–6.
110. Fuhrman J. Viruses in Marine Planktonic Systems / J. Fuhrman, C. Suttle // *Oceanography*. – 1993. – V. 6, № 2. – P. 51–63.
111. Fuhrman J. A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects // *Nature*. – 1999. – V. 399, № 6736. – P. 541–548.
112. Fujii T. Novel capsid genes (g23) of T4-type bacteriophages in a Japanese paddy field / T. Fujii, N. Nakayama, M. Nishida, H. Sekiya, N. Kato, S. Asakawa, M. Kimura // *Soil Biol. Biochem.* – 2008. – V. 40, № 5. – P. 1049–1058.
113. Fuller N. J. Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques / N. J. Fuller, W. H. Wilson, I. R. Joint, N. H. Mann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64, № 6. – P. 2051–2060.
114. Galach'yants A. D. Taxonomic Composition of Lake Baikal Bacterioneuston Communities / A. D. Galach'yants, N. L. Bel'kova, E. V. Sukhanova, Yu. P. Galach'yants, A. A. Morozov, V. V. Parfenova // *Microbiology* – 2017. – V. 86, № 2. – P. 241–249.
115. Gao E. Isolation of a novel cyanophage infectious to the filamentous cyanobacterium *Planktothrix agardhii* (Cyanophyceae) from Lake Donghu, China / E. B. Gao, X. P. Yuan, R. H. Li, Q.Y. Zhang // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2009. – V. 54, № 2. – P. 163–170.
116. Garin-Fernandez A. Marine Genomics The North Sea goes viral : Occurrence and distribution of North Sea bacteriophages / A. Garin-fernandez // *Mar. Genomics*. – 2018. – V. 41, № April. – P. 31–41.
117. Ge X. Viral metagenomics analysis of planktonic viruses in East Lake, Wuhan, China / X. Ge, Y. Wu, M. Wang, J. Wang, L. Wu, X. Yang, Y. Zhang, Z. Shi // *Virol. Sin.* – 2013. – V. 28, № 5. – P. 280–290.

118. Gibbs A. J. What's in a Virus Name? / A. J. Gibbs, B. D. Harrison, D. H. Watson, P. Wildy // *Nature*. – 1966. – V. 209. – P. 450–454.
119. Gong Z. Viral Diversity and Its Relationship With Environmental Factors at the Surface and Deep Sea of Prydz Bay , Antarctica / Z. Gong, Y. Liang, M. Wang, Y. Jiang, Q. Yang, J. Xia, X. Zhou, S. You1, C. Gao, J. Wang, J. He, H. Shao, A. McMinn // – *Aquatic Microbiology* – 2018. – V. 9, № December. – P. 1–17.
120. Grachev M. A. Distemper virus in Baikal seals / M. A. Grachev, V. P. Kumarev, L. V. Mamaev, V. L. Zobin, L. V. Baranova, N. N. Denikina, S. I. Belikov, E. A. Petrov, V. S. Kolesnik, R. S. Kolesnik, V. M. Dorofeev, A. M. Beim, V. N. Kudelin, F. G. Nagieva, V. N. Sidorov // *Nature*. – 1989. – V. 338, № 6212. – P. 209–209.
121. Green J. C. Metagenomic assessment of viral diversity in lake matoaka, a temperate, eutrophic freshwater lake in southeastern Virginia, USA / J. Green, F. Rahman, M. A. Saxton, K. Williamson // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2015. – V. 75, № 2. – P. 117–128.
122. Gu X. Geospatial distribution of viromes in tropical freshwater ecosystems / X. Gu, Q. Xiang, M. Tayb, S. Harn, T. Nazanin, S. Shin, G. Goha, A. Kushmaro, J. R. Thompson, K. Yew-Hoong Gin // *Water Res.* – 2018. – V. 137. – P. 220–232.
123. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T. Hall // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 1999. – V. 41. – P. 95–98.
124. Hambly E. A conserved genetic module that encodes the major virion components in both the coliphage T4 and the marine cyanophage S-PM2 / E. Hambly, F. Tétart, C. Desplats, W. H. Wilson, H. M. Krisch, N. H. Mann // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – V. 98, № 20. – P. 11411–11416.
125. Hara S. Abundance of viruses in deep oceanic waters / S. Haral, I. Koike, K. Terauchi, H. Kamiya, E. Tanoue // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1996. – V. 145. – P. 269–277.
126. Hara S. Abundance of Viruses in Marine Waters: Assessment by Epifluorescence and Transmission Electron Microscopy / S. Hara, K. Terauchi, I.

- Koike // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1991. – V. 57, № 9. – P. 2731–2734.
127. Harper D. Bacteriophages and Biofilms / D. R. Harper, H. M. R. T. Parracho, J. Walker, R. Sharp, G. Hughes, M. Werthén, S. Lehman, S. Morales // *Antibiotics.* – 2014. – V. 3, № 3. – P. 270–284.
128. Harrison B.K. Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California) / B. K. Harrison, H. Zhang, W. Berelson, V. J. Orphan // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 75, № 6. – P. 1487–1499.
129. He M. Phylogenetic Diversity of T4-Type Phages in Sediments from the Subtropical Pearl River Estuary / M. He, L. Cai, C. Zhang, N. Jiao, R. Zhang // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8.
130. Henn M. The Genome Sequence of *Synechococcus* phage S-CAM1 0208SB26 National Center for Biotechnology Information. Bethesda, MD, USA: NIH, unpublished / M. Henn // 2013.
131. Hennes K. P. Significance of bacteriophages for controlling bacterioplankton growth in a mesotrophic lake / K. P. Hennes, M. Simon // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V. 61, № 1. – P. 333–340.
132. Hennes K. P. Fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities / K. P. Hennes, C. A. Suttle, A. M. Chan // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. V. 61, № 10. – P. 3623–3627.
133. Hjorleifsdottir S. Isolation, growth and genome of the *Rhodothermus* RM378 thermophilic bacteriophage / S. Hjorleifsdottir, A. Aevansson, G. O. Hreggvidsson, O. H. Fridjonsson, J. K. Kristjansson // *Extremophiles.* – 2014. – V. 18, № 2. – P. 261–270.
134. Hofer J. S. Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: Importance of filamentous forms / J. S. Hofer, R. Sommaruga // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2001. – V. 26, № 1. – P. 1–11.
135. Holmes F. O. Order Virales; the filterable viruses, in *Bergey's Manual of Determinative Biology*, 6th / F. O. Holmes // ed. E. Breed, R. S., Murray, E. G. D.,

- and Hitchens, A. P. : Williams & Wilkins, Baltimore, – 1948. – P. 1126-1144.
136. Hsiao C. L. Head morphogenesis of bacteriophage T4. III. The role of gene 20 in DNA packaging. / C. L. Hsiao, L.W. Black // *Virology*. – 1978. – V. 91, № 1. – P. 26–38.
137. Huang H. - Z. Genetic diversity of T4 virioplankton, inferred from g23 gene, in Wuhan Donghu Lake / H. - Z. Huang, K. Cheng, M. Xu // *CHINA Environ. Sci.* – 2011. – V. 31, № 3. – P. 443–447.
138. Huang Y. CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences / Y. Huang, B. Niu, Y. Gao, L. Fu, W. Li // *Bioinformatics*. – 2010. – V. 26, № 5. – P. 680–682.
139. Huelsenbeck J. P. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees / J. P. Huelsenbeck, F. Ronquist // *Bioinformatics*. – 2001. – V. 17, № 8. – P. 754–755.
140. Humbert J. - F. Comparison of the structure and composition of bacterial communities from temperate and tropical freshwater ecosystems / J. - F. Humbert, U. Dorigo, P. Cecchi, B. Le Berre, D. Debroyas, M. Bouvy // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 9. – P. 2339–2350.
141. Hurwitz B. L. The Pacific Ocean Virome (POV): A Marine Viral Metagenomic Dataset and Associated Protein Clusters for Quantitative Viral Ecology / B. L. Hurwitz, M. B. Sullivan // *PLoS One*. – 2013. – V. 8, № 2 – P. e57355.
142. Hutchinson G. E. The Paradox of the Plankton / G. E. Hutchinson // *Am. Nat.* – 1961. – V. 95, № 882. – P. 137–145.
143. Ivanov A. Useful scripts for bioinformatics purposes [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/ivartb/scripts> (дата обращения: 12.11.2019).
144. Jacquet S. Suivi scientifique du lac du Bourget - Année 2007 / S. Jacquet, , D. Barbet, C. Barbier, S. Cachera, M. Colon, L. Espinat, C. Girel, J. Guillard, V. Hamelet, J. C. Hustache, D. Lacroix, L. Laine, B. Leberre, J. Neasat, G. Paolini, M. Perga, P. Perney, F. Rimet // – 2008. – 162 p.
145. Jamindar S. Evaluation of two approaches for assessing the genetic similarity

- of viroplankton populations as defined by genome size / S. Jamindar, S. W. Polson, S. Srinivasiah, L. Waidner, K. E. Wommack // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78, № 24. – P. 8773–8783.
146. Jia Z. Molecular characterization of T4-type bacteriophages in a rice field / Z. Jia, R. Ishihara, Y. Nakajima, S. Asakawa, M. Kimura // *Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 9, № 4. – P. 1091–1096.
147. Jiang S. Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment / S. Jiang, J. Paul // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1994. – V. 104. – P. 163–172.
148. Jiang S. Occurrence of lysogenic bacteria in marine microbial communities as determined by prophage induction / S. Jiang, J. Paul // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1996. – V. 142. – P. 27–38.
149. Jiang S. C. Gene Transfer by Transduction in the Marine Environment / S. C. Jiang, J. H. Paul // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64, № 8. – P. 2780–2787.
150. Jin M. Diversities and potential biogeochemical impacts of mangrove soil viruses / M. Jin, X. Guo, R. Zhang, W. Qu, B. Gao, R. Zeng // *Microbiome.* – 2019. – V. 7, № 1. – P. 1–15.
151. Jurczak-Kurek A. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage / A. Jurczak-Kurek, T. Gąsior, B. Nejman-Faleńczyk, S. Bloch, A. Dydecka, G. Topka, A. Necel, M. Jakubowska-Deredas, M. Narajczyk, M. Richert, A. Mieszkowska, B. Wróbel, G. Węgrzyn, A. Węgrzyn // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6, № 1. – P. 34338.
152. Katano T. Abundance and pigment type composition of picocyanobacteria in Barguzin Bay, Lake Baikal / T. Katano, S. Nakano, O. Mitamura, H. Yoshida, H. Azumi, Y. Matsuura, Y. Tanaka, H. Maezono, Y. Satoh, T. Satoh, Y. Sugiyama, Y. Watanabe, T. Mimura, Y. Akagashi, H. Machida, V. V. Drucker, I. Tikhonova, O. Belykh, V. A. Fialkov, M. - S. Han, S. - H. Kang, M. Sugiyama // *Limnology.* – 2008. – V. 9, № 2. – P. 105–114.
153. Kausche G. Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop

- / G. Kausche, E. Pfankuch, H. Ruska // *Naturwissenschaften*. – 1939. – V. 27. – P. 292–299.
154. Kawai Y. Thermal transition profiles of bacteriophage T4 and its DNA / Y. Kawai // *J. Gen. Appl. Microbiol.* – 1999. – V. 45, № 3. – P. 135–138.
155. Khodzher T. V. Current chemical composition of Lake Baikal water / T. V. Khodzher, V. M. Domysheva, L. M. Sorokovikova, M. V. Sakirko, I. V. Tomberg // *Inl. Waters*. – 2017. – V. 7, № 3. – P. 250–258.
156. Khodzher T. V. Hydrochemical studies in Lake Baikal: history and nowadays / T. V. Khodzher, V. M. Domysheva, L. M. Sorokovikova, I. V. Tomberg, M. V. Sakirko // *Limnol. Freshw. Biol.* – 2018. № 1. – P. 2–9.
157. Kieft K. VIBRANT: Automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of virome function from genomic sequences / K. Kieft, Z. Zhou, K. Anantharaman // *Microbiome*. – 2020. – V. 8(90) – P. 855387.
158. Kim D. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences / D. Kim, L. Song, F. P. Breitwieser, S. L. Salzberg // *Genome Res.* – 2016. – V. 26 – P. 1–9.
159. King A. M. Q. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* / A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz // Elsevier : 2012. – 1327 p.
160. Klut M. E., Stockner J.G. Virus-Like Particles in an Ultra-Oligotrophic Lake on Vancouver Island, British Columbia / M. E. Klut, J. G. Stockner // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1990. – V. 47. № 4. – P. 725–730.
161. Knapik K. Wide bacteriophage diversity in a single terrestrial aquatic site / K. Knapik, M. B. Prentice // Unpublished. 2012.
162. Kontula T. Endemic diversification of the monophyletic cottoid fish species flock in Lake Baikal explored with mtDNA sequencing / T. Kontula, S. V. Kirilchik, R. Väinölä // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2003. – V. 27, № 1. – P. 143–155.
163. Kumar S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V.

33, № 7 – P. msw054.

164. Kurilkina M. I. Bacterial community composition in the water column of the deepest freshwater Lake Baikal as determined by next-generation sequencing / M. I. Kurilkina, Y. R. Zakharova, Y. P. Galachyants, D. P. Petrova, Y. S. Bukin, V. M. Domyшева, V. V. Blinov, Y. V. Likhoshway // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2016. – V. 92, № 7. – P. fiw094.

165. Kutter E. Bacteriophages: Biology and Applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze – Boca Raton-London- New York- Washington: CRC Press, 2005. – 528 p.

166. Laybourn-Parry J. Viruses in the plankton of freshwater and saline Antarctic lakes / J. Laybourn-Parry, J. S. Hofer, R. Sommaruga // *Freshw. Biol.* – 2001. – V. 46, № 9. – P. 1279–1287.

167. Leiman P. G. Structure and morphogenesis of bacteriophage T4 / P. G. Leiman, S. Kanamaru, V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka, M. G. Rossmann// *Cell. Mol. Life Sci.* – 2003. – V. 60, № 11. – P. 2356–2370.

168. Lenski R. E. Dynamics of Interactions between Bacteria and Virulent Bacteriophage / R.E. Lenski // *Advances in Microbial Ecology* / K.C. Marshall (eds). Boston, MA: Springer US. – 1988. – P. 1–44.

169. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease / K. Lewis // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2007. – V. 5, № 1. – P. 48–56.

170. Li H. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools / H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin // *Bioinformatics.* – 2009. – V. 25, № 16. – P. 2078–2079.

171. Li Z. Molecular Identification of the Bloom-forming Cyanobacterium *Anabaena* from North Han River System in Summer 2012 / Z. Li, M. - S. Han, B.-H. Kim // *Korean J. Limnology.* – 2013. – V. 46, № 2. – P. 301–309.

172. Likhoshway Ye. V. Baikal seal virus / Ye. V. Likhoshway, M. A. Grachev, V. P. Kkumarev, Y. V. Solodun, O. A. Golberg, O. I. Belykh, F. G. Nagieva, V. G. Nikulina, B. S. Kolesnik // *Nature.* – 1989. – V. 339, № 6222. – P. 266–266.

173. López-Bueno A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake

- / A. López-Bueno<sup>1</sup>, J. Tamames, D. Velázquez, A. Moya, A. Quesada, A. Alcamí  
// *Science* (80-. ). – 2009. – V. 326, № 5954. – P. 858–861.
174. Lozupone C. A. Species divergence and the measurement of microbial diversity / C. A. Lozupone, R. Knight // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2008. – V. 32, № 4. – P. 557–578.
175. Lozupone C., Knight R. Global patterns in bacterial diversity / C. Lozupone, R. Knight // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – V. 104, № 27. – P. 11436–11440.
176. Lozupone C. UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities / C. Lozupone, R. Knight // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, № 12. – P. 8228–8235.
177. Lwoff A. A System of Viruses / A. Lwoff, R. Horne, P. Tournier // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 1962. – V. 27. – P. 51–55.
178. Maranger R. Viral and bacterial dynamics in Arctic sea ice during the spring algal bloom near Resolute, N.W.T., Canada / R. Maranger, D. Bird, S. Juniper // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1994. – V. 111. – P. 121–127.
179. Maranger R. Viral abundance in aquatic systems : a comparison between marine and fresh waters / R. Maranger, D. F. Bird // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1995. – V. 121, № 1–3. – P. 217–226.
180. Marie D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I / D. Marie, F. Partensky, S. Jacquet, D. Vaultot // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – V. 63, № 1. – P. 186–193.
181. Marie D. Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry / D. Marie, C. P. D. Brussaard, R. Thyraug, G. Bratbak, D. Vaultot // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65, № 1. – P. 45–52.
182. Martin E. L. Phages of cyanobacteria / E. L. Martin, R. Benson // – 1988. – V. In R. Cale. – P. 607-645 .
183. Martin E. L. Cyanophages : Encyclopedia of Virology. / E. L. Martin, A. K.

Tyler – Academic Press. – 1999. 2000 p.

184. Masella A. P. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences / A. P. Masella, A. K. Bartram, J. M. Truszkowski, D. G. Brown, J. D. Neufeld // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – V. 13, № 1. – P. 31.

185. Mathias C. B. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the Danube River / C. B. Mathias, A. K. T. Kirschner, B. Velimirov // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V. 61, № 10. – P. 3734–3740.

186. Matthews R. E. F. The history of viral taxonomy / R. E. F. Matthews – Boca Raton: CRC Press, 1983. – P. 1-35.

187. Meyer F. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes / F. Meyer, D. Paarmann, M. D'Souza, R. Olson, E. M. Glass, M. Kubal, T. Paczian, A. Rodriguez, R. Stevens, A. Wilke, J. Wilkening, R. A. Edwards // *BMC Bioinformatics*. – 2008. – V. 9, № 1. – P. 386.

188. Mida J. L. Long-term and recent changes in southern Lake Michigan water quality with implications for present trophic status / J. L. Mida, D. Scavia, G. L. Fahnenstiel, S. A. Pothoven, H. A. Vanderploeg, D. M. Doland // *J. Great Lakes Res.* – 2010. – V. 36. – P. 42–49.

189. Middelboe M. Viruses in freshwater ecosystems: an introduction to the exploration of viruses in new aquatic habitats / M. Middelboe, S. Jacquet, M. Weinbauer // *Freshw. Biol.* – 2008. – V. 53, № 6. – P. 1069–1075.

190. Mikhailov I. S. Similarity of structure of taxonomic bacterial communities in the photic layer of Lake Baikal's three basins differing in spring phytoplankton composition and abundance / I. S. Mikhailov, Yu. R. Zakharova, Yu. P. Galachyants, M. V. Usoltseva, D. P. Petrova, M. V. Sakirko, Ye. V. Likhoshway, M. A. Grachev // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2015. – V. 465, № 1. – P. 413–419.

191. Millard A. Genetic organization of the *psbAD* region in phages infecting marine *Synechococcus* strains / A. Millard, M. R. J. Clokie, D. A. Shub, N. H. Mann // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2004. – V. 101, № 30. – P. 11007–11012.

192. Millard A.D. Comparative genomics of marine cyanomyoviruses reveals the widespread occurrence of *Synechococcus* host genes localized to a hyperplastic region: implications for mechanisms of cyanophage evolution / A. D. Millard, K. Zwirgmaier, M. J. Downey, N. H. Mann, D. J. Scanlan // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 11, № 9. – P. 2370–2387.
193. Millard A. D. Biogeography of bacteriophages at four hydrothermal vent sites in the Antarctic based on g23 sequence diversity / A. D. Millard, D. Pearce, K. Zwirgmaier // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2016. – V. 363, № 7. – P. 1–12.
194. Moebus K. Bacteriophage sensitivity patterns among bacteria isolated from marine waters / K. Moebus, H. Nattkemper // *Helgoländer Meeresuntersuchungen.* – 1981. – V. 34, № 3. – P. 375–385.
195. Mohiuddin M. Spatial and temporal dynamics of virus occurrence in two freshwater lakes captured through metagenomic analysis / M. Mohiuddin, H. E. Schellhorn // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6, № SEP. – P. 1–13.
196. Murtagh F. Comments on "Parallel algorithms for hierarchical clustering and cluster validity / F. Murtagh // *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* – 1992. – V. 14, № 10. – P. 1056–1057.
197. Nakai R. Metagenomic Analysis of 0.2- $\mu$ m-Passable Microorganisms in Deep-Sea Hydrothermal Fluid / R. Nakai, T. Abe, H. Takeyama, T. Naganuma // *Mar. Biotechnol.* – 2011. – V. 13, № 5. – P. 900–908.
198. Noble R. T. Breakdown and microbial uptake of marine viruses and other lysis products / R. T. Noble, J. A. Fuhrman // *Aq Microb Ecol.* – 1999. – V. 20. – P. 1–11.
199. Noble R. T. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria / R. T. Noble, J. A. Fuhrman // *Aquat. Microb. Ecol.* – 1998. – V. 14, № 2. – P. 113–118.
200. Okazaki Y. Genome - resolved viral and cellular metagenomes revealed potential key virus - host interactions in a deep freshwater lake / Y. Okazaki, Y. Nishimura, T. Yoshida, H. Ogata, S. - I. Nakano // *Environ. Microbiol.* – 2019. – V. 21, № 12. – P. 4740–4754.

201. Paez-Espino D. Uncovering Earth's virome / D. Paez-Espino, E. A. Eloe-Fadrosh, G. A. Pavlopoulos, A. D. Thomas, M. Huntemann, N. Mikhailova, E. Rubin, N. N. Ivanova, N. C. Kyrpides // *Nature*. – 2016. – V. 536, № 7617. – P. 425–430.
202. Parada V. Viral Abundance, Decay, and Diversity in the Meso- and Bathypelagic Waters of the North Atlantic / V. Parada, E. Sintes, H. M. van Aken, M. G. Weinbauer, G. J. Herndl // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – V. 73, № 14. – P. 4429–4438.
203. Parada V. Viral burst size of heterotrophic prokaryotes in aquatic systems / V. Parada, G. J. Herndl, M. G. Weinbauer // *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*. – 2006. – V. 86, № 3. – P. 613–621.
204. Parfenova V. V. Comparative analysis of biodiversity in the planktonic and biofilm bacterial communities in Lake Baikal / V. V. Parfenova, A. S. Gladkikh, O. I. Belykh // *Microbiology*. – 2013. – V. 82, № 1. – P. 91–101.
205. Parker M. L. Nucleotide Sequence of Bacteriophage T4 Gene 23 and the Amino Acid Sequence of its Product / M. L. Parker, A. C. Christensen, A. Boosman, J. Stockard, E. T. Young, A. H. Doermann // *J Mol Biol.* – 1984. – P. 399–416.
206. Parsons T. R. Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis / T. R. Parsons, Y. Maita, C. Lalli – New York: Pergamon Press, 1984. – 188 p.
207. Paul J. H. Distribution of viral abundance in the reef environment of Key Largo, Florida / J. H. Paul, J. B. Rose, S. C. Jiang, C. A. Kellogg, L. Dickson // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, № 3. – P. 718–724.
208. Perga M. E. Suivi de la qualité des eaux du lac d'Annecy / M.E. Perga, 2016. SILA (éd.). – 122 p.
209. Popovskaya G. Ecological monitoring of phytoplankton in Lake Baikal / G. Popovskaya // *Aquat. Ecosyst. Heal. Manag.* – 2000. – V. 3, № 2. – P. 215–225.
210. Porter K. G. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora / K. G. Porter, Y. S. Feig // *Limnol. Oceanogr.* – 1980. – V. 25, № 5. –

P. 943–948.

211. Potapov S. Assessing the diversity of the g23 gene of T4-like bacteriophages from Lake Baikal with high-throughput sequencing / S. Potapov, O. Belykh, A. Krasnopeev, A. Gladkikh, M. Kabilov, A. Tupikin, T. Butina // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2018. – V. 365, № 3 – P. fnx264.

212. Potapov S. A. Genetic diversity of T4-like bacteriophages in Lake Baikal / S. A. Potapov, T. V. Butina, O. I. Belykh, S. I. Belikov // *The Bull. Irkutsk State Univ. Ser. «Biology. Ecol.»* – 2013. – V. 3, № 1. – P. 14–19.

213. Potapov S. A. Metagenomic analysis of virioplankton from the pelagic zone of lake baikal / S. A. Potapov, I. V. Tikhonova, A. Yu. Krasnopeev, M. R. Kabilov, A. E. Tupikin, N. S. Chebunina, N. A. Zhuchenko, O. I. Belykh // *Viruses.* – 2019. – V. 11, № 11 – P. 1–15.

214. Proctor L. M. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria / L. M. Proctor, J. Fuhrman // *Nature.* – 1990. – V. 343. – P. 60–62.

215. Rambaut A. Tracer v1.6. Available online at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> // 2013.

216. Regenmorlel M. H. V. Virus species, a much overlooked but essential concept in virus classification / M. H. V. Regenmorlel // *Intervirology.* – 1990. – V. 31, № 5. – P. 241–254.

217. Reyes A. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut / A. Reyes, N. P. Semenkovich, K. Whiteson, F. Rohwer, J. I. Gordon // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2012. – V. 10, № 9. – P. 607–617.

218. Ripp S. Transduction of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1. / S. Ripp, O. A. Ogunseitan, R. V. Miller // *Mol. Ecol.* – 1994. – V. 3, № 2. – P. 121–126.

219. Robinson J. T. Integrative genomics viewer / J. T. Robinson, H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz, J. P. Mesirov // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – V. 29, № 1. – P. 24–26.

220. Rodriguez-Brito B. Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments / B. Rodriguez-Brito, L. Li, L. Wegley, M. Furlan, F. Angly, M.

Breitbart, J. Buchanan, C. Desnues, E. Dinsdale, R. Edwards, B. Felts, M. Haynes, H. Liu, D. Lipson, J. Mahaffy, A. Belen Martin-Cuadrado, A. Mira, J. Nulton, L. Pasić, S. Rayhawk, J. Rodriguez-Mueller, F. Rodriguez-Valera, P. Salamon, S. Srinagesh, T. F. Thingstad, T. Tran, R. V. Thurber, D. Willner, M. Youle, F. Rohwer // *Isme J.* – 2010. – V. 4, № 6. – P. 739–751.

221. Roux S. Assessing the diversity and specificity of two freshwater viral communities through metagenomics / S. Roux, F. Enault, A. Robin, V. Ravet, S. Personnic, S. Theil, J. Colombet, T. Sime-Ngando, D. Debroas // *PLoS One.* – 2012. – V. 7, № 3. – P. e33641.

222. Roux S. Genomic characteristics and environmental distributions of the uncultivated Far-T4 phages / S. Roux, F. Enault, V. Ravet, O. Pereira, M. B. Sullivan // *Front. Microbiol.* – 2015. – V. 6, № MAR. – P. 1–13.

223. Roux S. Towards quantitative viromics for both double-stranded and single-stranded DNA viruses / S. Roux, N. E. Solonenko, V. T. Dang, B. T. Poulos, S. M. Schwenck, D. B. Goldsmith, M. L. Coleman, M. Breitbart, M. B. Sullivan // *PeerJ.* – 2016. – V. 4. – P. e2777.

224. Rozas J. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets / J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins, A. Sánchez-Gracia // *Mol Biol Evol.* – 2017. V. 1, № 34. – P. 3299–3302.

225. Ruska H. Versuch zu einer Ordnung der Virusarten / H. Ruska // *Arch. Gesamte Virusforsch.* – 1943. – V. 2, № 5. – P. 480–498.

226. Safferman R. S. Algal virus: isolation / R. S. Safferman, M. E. Morris // *Science.* – 1963. – V. 140, № 3567. – P. 679–680.

227. Sanders R.W. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison / R. W. Sanders, D. A. Caron, U. G. Berninger // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1992. – V. 86. – P. 1–14.

228. Sano E. Movement of Viruses between Biomes / E. Sano, S. Carlson, L. Wegley, F. Rohwer // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 70, № 10. – P. 5842–5846.

229. Schopf J. W. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. / J. W. Schopf // *Science*. – 1993. – V. 260. – P. 640–646.
230. Schroder H. C. Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake Baikal / H. C. Schröder, S. M. Efremova, V. B. Itskovich, S. Belikov, Y. Masuda, A. Krasko, I. M. Müller, W. E. G. Müller // *J. Zool. Syst. Evol. Res.* – 2003. – V. 41, № 2. – P. 80–86.
231. Schroeder D. C. Coccolithovirus (Phycodnaviridae): Characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliana huxleyi* / D. C. Schroeder, J. Oke, G. Malin, W. H. Wilson // *Arch. Virol.* – 2002. – V. 147, № 9. – P. 1685–1698.
232. Schwalbach M. Viral effects on bacterial community composition in marine plankton microcosms / M. Schwalbach, I. Hewson, J. Fuhrman // *Aquat. Microb. Ecol.* – 2004. – V. 34. – P. 117–127.
233. Shane M. S. Distribution of blue-green algal viruses in various types of natural waters / M. S. Shane // *Water Res.* – 1971. – V. 5, № 9. – P. 711–716.
234. Shibata A. Formation of submicron colloidal particles from marine bacteria by viral infection / A. Shibata, K. Kogure, I. Koike, K. Ohwada // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1997. – V. 155. – P. 303–307.
235. Short C. M. Nearly Identical Bacteriophage Structural Gene Sequences Are Widely Distributed in both Marine and Freshwater Environments Nearly Identical Bacteriophage Structural Gene Sequences Are Widely Distributed in both Marine and Freshwater Environments / C. M. Short, C. Suttle // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – V. 71, № 1. – P. 480–486.
236. Short S. M. The construction and analysis of marker gene libraries / S. M. Short, F. Chen, S. W. Wilhelm // *Man. Aquat. Viral Ecol.* – 2010. – V. 155. – P. 82–91.
237. Shtykova Y. R. Microbiological water quality of Lake Baikal: a review / Yu. R. Shtykova, M. Yu. Suslova, V. V. Drucker, O. I. Belykh // *Limnol. Freshw. Biol.* – 2019. № 2. – P. 210–217.
238. Silva B. S. O. Virioplankton assemblage structure in the lower river and

- ocean continuum of the Amazon / B. S. de O. Silva, F. H. Coutinho, G. B. Gregoracci, L. Leomil, L. S. de Oliveira, A. Fróes, D. Tschoeke, A. C. Soares, A. S. Cabral, N. D. Ward, J. E. Richey, A. V. Krusche, P. L. Yager, C. Eduardo de Rezende, C. C. Thompson, F. L. Thompson // *mSphere*. – 2017. – V. 2, № 5. – P. 1–17.
239. Skvortsov T. Metagenomic characterisation of the viral community of lough neagh, the largest freshwater lake in Ireland / T. Skvortsov, C. de Leeuwe, J. P. Quinn, J. W. McGrath, C. C. R. Allen, Y. McElarney, C. Watson, K. Arkhipova, R. Lavigne, L. A. Kulakov // *PLoS One*. – 2016. – V. 11, № 2. – P. 1–19.
240. Sneath P. H. A. Numerical Taxonomy: The Principles and Praticce of Numerical Classification / P. H. A. Sneath, R. R. Sokal – San Francisco: Freeman, 1973. – 573 p.
241. Sorokovikova L. M. Chemical composition and quality of water of the Selenga River and its tributaries in Mongolia / L. M. Sorokovikova, I. V. Tomberg, O. G. Stepanova, I. I. Marinaite, N. V. Bashenkhaeva, S. Khash-Erdene, A. P. Fedotov // *Limnol. Freshw. Biol.* – 2019. – V. 6. – P. 332–338.
242. Spencer R. A marine bacteriophage / R. Spencer // *Nature*. – 1955. – V. 175. – P. 690.
243. Spencer R. Indigenous marine bacteriophages / R. Spencer // *J. Bacteriol.* – 1960. – V. 79. – P. 614.
244. Stockner J. G., Antia N. J. Algal Picoplankton from Marine and Freshwater Ecosystems: A Multidisciplinary Perspective / J. G. Stockner, N. J. Antia // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* – 1986. – V. 43. № 12. – P. 2472–2503.
245. Straškrábová V. Primary production and microbial activity in the euphotic zone of Lake Baikal (Southern Basin) during late winter / V. Straškrábová, L. R. Izmet'yevac, E. A. Maksimova, S. Fietzd, J. Nedoma, J. Borovec, G. I. Kobanova, E. V. Shchetinina, E. V. Pislegina // *Glob. Planet. Change*. – 2005. – V. 46, № 1–4 SPEC. ISS. – P. 57–73.
246. Sullivan M. B. Three Prochlorococcus Cyanophage Genomes: Signature Features and Ecological Interpretations / M. B. Sullivan, M. L. Coleman, P.

- Weigele, F. Rohwer, S. W. Chisholm // *PLoS Biol.* – 2005. – V. 3, № 5. – P. e144.
247. Sullivan M. B. Genomic analysis of oceanic cyanobacterial myoviruses compared with T4-like myoviruses from diverse hosts and environments / M. B. Sullivan, K. H. Huang, J. C. Ignacio-Espinoza, A. M. Berlin, L. Kelly, P. R. Weigele, A. S. De Francesco, S. E. Kern, L. R. Thompson, S. Young, C. Yandava, R. Fu, B. Krastins, M. Chase, D. Sarracino, M. S. Osburne, M. R. Henn, S. W. Chisholm // *Environ. Microbiol.* – 2010. – V. 12, № 11. – P. 3035–3056.
248. Sullivan M. B. Cyanophages infecting the oceanic cyanobacterium *Prochlorococcus* / M. B. Sullivan, J. B. Waterbury, S. W. Chisholm // *Nature.* – 2003. – V. 424, № 6952. – P. 1047–1051.
249. Sullivan M. J. Easyfig: a genome comparison visualizer / M. J. Sullivan, N. K. Petty, S. A. Beatson // *Bioinformatics.* – 2011. – V. 27, № 7. – P. 1009–1010.
250. Suttle C. A. Cyanophages and Their Role in the Ecology of Cyanobacteria / C. A. Suttle // *The Ecology of Cyanobacteria.* – 2002. – P. 563–589.
251. Suttle C. A. Viruses in the sea / C. A. Suttle // *Nature.* – 2005. – V. 437, № 7057. – P. 356–361.
252. Suttle C. A. Marine viruses – major players in the global ecosystem / C. A. Suttle // *Nature Reviews Microbiology.* – 2007. – V. 5, № 10. – P. 801–812.
253. Suttle C. A. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity / C. A. Suttle, A. M. Chan, M. T. Cottrell // *Nature.* – 1990. – V. 347, № 6292. – P. 467–469.
254. Sykilinda N. N. Complete Genome Sequence of the Novel Giant *Pseudomonas* Phage PaBG / N. N. Sykilinda, A. A. Bondar, A. S. Gorshkova, L. P. Kurochkina, E. E. Kulikov, M. M. Shneider, V. A. Kadykov, N. V. Solovjeva, M. R. Kabilov, V. V. Mesyanzhinov, V. V. Vlassov, V. V. Drukker, K. A. Miroshnikov // *Genome Announc.* – 2014. – V. 2, № 1. – P. e00929-13.
255. Tapper M. A., Hicks R. E. Temperate viruses and lysogeny in Lake Superior bacterioplankton / M. A. Tapper, R. E. Hicks // *Limnol. Oceanogr.* – 1998. – V. 43, № 1. – P. 95–103.
256. Thurber R. V. Laboratory procedures to generate viral metagenomes / R. V.

- Thurber, M. Haynes, M. Breitbart, L. Wegley, F. Rohwer // *Nat. Protoc.* – 2009. – V. 4, № 4. – P. 470–483.
257. Tian X. The Use of High-Throughput Amplicon Deep Sequencing to Explore Aquatic Virus Communities / X. Tian // *University of British Columbia.* – 2015. № March. – P. 1–68.
258. Timoshkin O. A. Rapid ecological change in the coastal zone of Lake Baikal (East Siberia): Is the site of the world's greatest freshwater biodiversity in danger? / O. A. Timoshkina, D. P. Samsonov, M. Yamamuroc, M. V. Moore, O. I. Belykha, V. V. Malnik, M. V. Sakirko, A. A. Shirokaya, N. A. Bondarenko, V. M. Domysheva, G. A. Fedorova, A. I. Kochetkov, A. V. Kuzmina, A. G. Lukhneva, O. V. Medvezhonkova, A. V. Nepokrytykh, E. M. Pasyukova, A. E. Poberezhnaya, N. A. Bukshuka // *J. Great Lakes Res.* – 2016. – V. 42, № 3. – P. 487–497.
259. Timoshkin O. A. Coastal zone of the world's great lakes as a target field for interdisciplinary research and ecosystem monitoring: Lake Baikal (East Siberia) / O. A. Timoshkin // *Limnol. Freshw. Biol.* – 2018. № 1. – P. 81–97.
260. Trubl G. Soil Viruses Are Underexplored Players in Ecosystem Carbon Processing / G. Trubl, H. B. Jang, S. Roux, J. B. Emerson, N. Solonenko, D. R. Vik, L. Solden, J. Ellenbogen, A. T. Runyon, B. Bolduc, B. J. Woodcroft, S. R. Saleska, G. W. Tyson, K. C. Wrighton, M. B. Sullivan, V. I. Rich // *mSystems.* – 2018. – V. 3, № 5. – P. 1–21.
261. Tseng C. - H. Microbial and viral metagenomes of a subtropical freshwater reservoir subject to climatic disturbances / C. - H. Tseng, P. - W. Chiang, F. - K. Shiah, Y. - L. Chen, J. - R. Liou, T. - C. Hsu, S. Maheswararajah, I. Saeed, S. Halgamuge, S. - L. Tang // *ISME J.* – 2013. – V. 7, № 12. – P. 2374–2386.
262. Tuomi P. Bacterial population dynamics in a meromictic Bacterial Population Dynamics in a Meromictic Lake / P. Tuomi, T. Torsvik, M. Haldal // *The ISME Journal.* – 1997. – V. 63, № 6. – P. 2181–2188.
263. Twort F. W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses / Twort F. W., Lond M. R. ed. *The Lancet*, 1915. – 1241-1243 p.

264. Vollenweider R. A. Eutrophication of waters. / R. A. Vollenweider, J. Kerekes – Monitoring assessment and control. Paris, 1982. – 154 p.
265. Wang G. Survey of major capsid genes (g23) of T4-type bacteriophages in rice fields in Northeast China / G. Wang, J. Jin, S. Asakawa, M. Kimuraa // *Soil Biol. Biochem.* – 2009a. – V. 41, № 2. – P. 423–427.
266. Wang G. Survey of major capsid genes (g23) of T4-type bacteriophages in Japanese paddy field soils / G. Wang, M. Hayashi, M. Saito, K. Tsuchiya, S. Asakawa, M. Kimura // *Soil Biol. Biochem.* – 2009b. – V. 41, № 1. – P. 13–20.
267. Wang K. Prevalence of highly host-specific cyanophages in the estuarine environment / K. Wang, F. Chen // *Environ. Microbiol.* – 2008. – V. 10, № 2. – P. 300–312.
268. Wang M. N. Genetic diversity and temporal dynamics of phytoplankton viruses in East Lake, China / M. - N. Wang, X. - Y. Ge, Y. - Q. Wu, X. - L. Yang, B. Tan, Y. - J. Zhang, Z. - L. Shi // *Virol. Sin.* – 2015. – V. 30, № 4. – P. 290–300.
269. Waterbury J. B. Resistance to co-occurring phages enables marine synechococcus communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. / J. B. Waterbury, F. W. Valois // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, № 10. – P. 3393–3399.
270. Waterson A. P. An Introduction to the History of Virology / A. P. Waterson, L. Wilkinson – Cambridge-London-New York-Melbourne: Cambridge, 1978. – 237 p.
271. Watkins S. C. Assessment of a metaviromic dataset generated from nearshore Lake Michigan / S. C. Watkins, N. Kuehnle, C. A. Ruggeri, K. Malki, K. Bruder, J. Elayyan, K. Damisch, N. Vahora, P. O'Malley, B. Ruggles-Sage, Z. Romer, C. Putonti // *Mar. Freshw. Res.* – 2015. – V. 67, № 11. – P. 1700–1708.
272. Weinbauer M. G. Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters / M. G. Weinbauer, C. A. Suttle // *Aquat. Microb. Ecol.* – 1997. – V. 13, № 3. – P. 225–232.
273. Weinbauer M. G., Peduzzi P. Significance of viruses versus heterotrophic nanoflagellates for controlling bacterial abundance in the northern Adriatic Sea /

- M. G. Weinbauer, P. Peduzzi // *J. Plankton Res.* – 1995. – V. 17, № 9. – P. 1851–1856.
274. Weinbauer M. G. Are viruses driving microbial diversification and diversity? / M. G. Weinbauer, F. Rassoulzadegan // *Environ. Microbiol.* – 2004. – V. 6, № 1. –P. 1–11.
275. Weisse T. Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake / T. Weisse, H. Müller, R. M. Pinto-Coelho, A. Schweizer, D. Springmann, G. Baldringer // *Limnol. Oceanogr.* – 1990. – V. 35, № 4. – P. 781–794.
276. Weitz J. S. Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles / J. S. Weitz, S. W. Wilhelm // *F1000 Biol Rep.* – 2012. – V. 8. № September. – P. 2–9.
277. White P. A. The effect of temperature and algal biomass on bacterial production and specific growth rate in freshwater and marine habitats / P. A. White, J. Kalff, J. B. Rasmussen, J. M. Gasol // *Microb. Ecol.* – 1991. – V. 21. – P. 99–118.
278. Wichels A. Bacteriophage diversity in the North Sea / A. Wichels, S. S. Biel, H. R. Gelderblom, T. Brinkhoff, G. Muyzer, C. Schütt // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – V. 64, № 11. – P. 4128–4133.
279. Wilcox R. M. Bacterial-viruses in coastal seawater-Lytic rather than lysogenic production / R. M. Wilcox, J. A. Fuhrman // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1994. – V. 114, № 1–2. – P. 35–45.
280. Wildy P. Classification and nomenclature of viruses: first report of the International Committee on Nomenclature of Viruses / P. Wildy – Madison: S. Karger, 1971. – 81 p.
281. Wilhelm S. W. Freshwater and marine virioplankton: A brief overview of commonalities and differences / S. W. Wilhelm, A. R. Matteson // *Freshw. Biol.* – 2008. – V. 53, № 6. – P. 1076–1089.
282. Wilhelm S. W. Viruses and Nutrient Cycles in the Sea / S. W. Wilhelm, C. Suttle // *Bioscience.* – 1999. – V. 49, № October. – P. 781.

283. Wilson W. H. Isolation and Molecular Characterization of Five Marine Cyanophages Propagated on *Synechococcus* sp. Strain WH7803 / H. W. Wilson, I. R. Joint, N. G. Carr, N. H. Mann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – V. 59, № 11. – P. 3736–3743.
284. Wilson W. H. Analysis of cyanophage diversity and population structure in a south-north transect of the Atlantic Ocean / W. H. Wilson, N. J. Fuller, I. R. Joint, N. H. Mann // *Bull. Inst. Ocean.* – 1999. – V. 19. – P. 209–216.
285. Wilson W. H. Analysis of cyanophage diversity in the marine environment using denaturing gradient gel electrophoresis / W. Wilson, N. J. Fuller, I. Joint, N. Mann // Halifax, Nov. Scotia, Canada. – 2000. – P. 565–570.
286. Wommack K. E. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. / K. E. Wommack, R. R. Colwell // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2000. – V. 64, № 1. – P. 69–114.
287. Xia X. *Synechococcus* Assemblages across the Salinity Gradient in a Salt Wedge Estuary / X. Xia, W. Guo, S. Tan, H. Liu // *Front. Microbiol.* – 2017. – V. 8. – P. 1254.
288. Yan-Ming L. Spatial distribution and morphologic diversity of virioplankton in Lake Donghu, China / L. Yan-Ming, Y. Xiu-Ping, Z. Qi-Ya // *Acta Oecologica.* – 2006. – V. 29, № 3. – P. 328–334.
289. Yoshida T. Ma-LMM01 Infecting Toxic *Microcystis aeruginosa* Illuminates Diverse Cyanophage Genome Strategies / T. Yoshida, K. Nagasaki, Y. Takashima, Y. Shirai, Y. Tomaru, Y. Takao, S. Sakamoto, S. Hiroishi, H. Ogata // *J. Bacteriol.* – 2008. – V. 190, № 5. – P. 1762–1772.
290. Yu D. Diversity and Distribution Characteristics of Viruses in Soils of a Marine-Terrestrial Ecotone in East China / D. Yu, L. Han, L. - M. Zhang, , J. - Z. He // *Microb Ecol.* – 2018. P. 375–386.
291. Zeidner G. Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by *psbA* analyses / G. Zeidner, C. M. Preston, E. F. Delong, R. Massana, A. F. Post, D. J. Scanlan, O. Béjà // *Environ. Microbiol.* – 2009. – V. 5, № 3. – P. 1–5.
292. Zheng C. Characterization of the Major Capsid Genes (*g23*) of T4-Type

- Bacteriophages in the Wetlands of Northeast China / C. Zheng, G. Wang, J. Liu, C. Song, H. Gao, X. Liu // *Microb. Ecol.* – 2013. – V. 65, № 3. – P. 616–625.
293. Zhong X. Differing assemblage composition and dynamics in T4-like myophages of two neighbouring sub-alpine lakes / X. Zhong, S. Jacquet // *Freshw. Biol.* – 2014. – V. 59, № 8. – P. 1577–1595.
294. Zhong Y. Phylogenetic Diversity of Marine Cyanophage Isolates and Natural Virus Communities as Revealed by Sequences of Viral Capsid Assembly Protein Gene g20 / Y. Zhong, F. Chen, St. W. Wilhelm, L. Poorvin, R. E. Hodson // *Society.* – 2002. – V. 68, № 4. – P. 1576–1584.
295. Zhu W., Lomsadze A., Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences / W. Zhu, A. Lomsadze, M. Borodovsky // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38. № 12. – P. e132–e132.
296. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Electronic resource]. – URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.
297. Irkutsk Supercomputer Center of SB RAS, <http://hpc.icc.ru>.
298. BLAST Assembled RefSeq Genomes [Electronic resource]. – URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ВЧ – вирусные частицы

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцДНК – двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

н.п. – нуклеотидные последовательности

нк – нуклеотид

ОТЕ – операционная таксономическая единица

оцДНК – одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота

ОЧБ – общая численность бактерий

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦ – проточная цитометрия

ПЦБ – пикоцианобактерии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

рРНК – рибосомная рибонуклеиновая кислота

т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЦКП – центр коллективного пользования

ЭФМ – эпифлуоресцентная микроскопия

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

EDTA – Этилендиаминтетрауксусная кислота

HTS – high-throughput sequencing

MCMC – Markov chain Monte carlo

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NGS – next generation sequencing (секвенирование следующего поколения, высокопроизводительное секвенирование)

NMDS – Non-metric multidimensional scaling

ТАЕ-буфер – Трис-ацетатный буфер