

УДК 578.4(262.5)

О.А. СТЕПАНОВА

Институт биологии южных морей НАН Украины
пр-т Нахимова, 2, Севастополь 99011**ВИРУСЫ В КРЫМСКОМ РЕГИОНЕ ЧЕРНОГО МОРЯ
(РЕЗУЛЬТАТЫ 1994 – 2010 гг.)**

Выявлена контаминация черноморской среды и гидробионтов вирусами суши. Путем эксперимента установлена возможность освоения вирусами суши гидробионтов. Изучена численность вирусов в микропланктоне и микробентосе. Были выделены и изучены новые для науки черноморские альговирuses (свыше 100 штаммов) четырех видов микроводорослей.

Ключевые слова: аллохтонные и автохтонные вирусы, альговирuses, Черное море

Вирусы гидросферы являются самыми многочисленными и наименее изученными организмами среди гидробионтов. Понимание роли вирусов в круговороте органического углерода в гидросфере, в процессах функционирования морских пищевых цепей и в биоразнообразии является основой для оценки стабильности морских экосистем, увеличивая предсказуемость воздействий глобальных изменений на биогеохимические процессы в Мировом Океане [8-10].

Начавшееся в середине 20 века изучение вирусов в Черном море было приостановлено в связи с отсутствием достаточно разработанных методик [2], поэтому имеющиеся сведения в этой области крайне ограничены. Циркуляция в черноморской среде вирусов аллохтонного и автохтонного происхождения и их взаимоотношения с различными видами организмов с учетом биотических факторов среды – актуальное и практически не изученное направление, которому и были посвящены наши исследования.

В ходе работы решались следующие задачи: выявление контаминаций черноморской среды аллохтонными вирусами и изучение возможного освоения ими новых хозяев – гидробионтов, определение численности вирусов в микропланктоне и микробентосе, поиск и изучение отдельных представителей автохтонных черноморских вирусов – альговирuses.

Материал и методы исследований

Материалом для изучения контаминации наземными вирусами черноморских гидробионтов служили пробы донных осадков (17), мантийная жидкость и мягкие ткани мидий *Mytilus galloprovincialis* (108 проб из 1300 особей), а также жабры разных видов морских рыб (17 проб из 86 особей). Сбор материала проводили в бухтах Севастополя в период 1994–2001 гг.

Также осуществлен анализ данных Севастопольской СЭС по мониторингу загрязнения морской воды из бухт Севастополя в 1990–1994 гг. патогенными вирусами человека (свыше 1000 проб). Сбор и обработка материала, методики вирусологических исследований, а также даты и места отбора проб подробно описаны в [5].

Численность вирусов и морских бактерий в период 1995–2001 гг. в пробах воды (свыше 50 проб) Севастопольской бухты и в донных отложениях (свыше 100 проб) бухт Севастополя и прибрежной части Крыма (1997, 1999, 2000 гг.) определяли классическим методом в эпифлуоресцентной микроскопии, что описано в [5].

Поиск альговирuses в период 2002–2010 гг. в пробах воды, донных отложений, мидий *Mytilus galloprovincialis* и жабр различных видов морских рыб проводили разработанным и запатентованным автором способом [Пат.65864А UA, №2003065499], при этом материал (свыше 300 проб) отбирали из бухт Севастополя и открытого моря, что отражено в [5, 6]. С 2007 г. по настоящее время ведется поиск альговирuses из проб воды и мидий, ежемесячно отбираемых из Севастопольской, Карантинной, Мартыновой (есть мидийная ферма) бухт и открытого моря.

В качестве индикаторных культур микроводорослей используются жидкие коллекционные культуры *Tetraselmis viridis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella viridis* (с 2008 г.) и *Prorocentrum pusilla* (с 2010г), полученные из отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ НАН Украины.

Изучение возможного освоения наземными вирусами гидробионтов проводили в эксперименте, используя бактериофаги фитопатогенных бактерий, полученные на кафедре вирусологии Киевского национального университета им. Тараса Шевченко, и культуры морских

миководорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum*. Методика проведения эксперимента основана на [Пат.65864А UA, №2003065499] и подробно описана в [3–5].

Результаты исследований и их обсуждение

Контаминация черноморской среды и гидробионтов наземными вирусами – патогенными вирусами человека (адено-, рео-, рота- и энтеровирусами, в т.ч. гепатита А, проб морской воды, донных осадков и материала из мидий) и бактериофагами фитопатогенных бактерий (жабры рыб) – наблюдалась от 2,1% до 74% от всех изученных проб. Полученные результаты свидетельствуют, что загрязнение наземными вирусами черноморской среды и гидробионтов чаще наблюдается в закрытых, подвергающихся сбросам канализационных стоков бухтах, а в качестве индикаторных организмов при изучении загрязнения наземными вирусами гидросферы могут служить черноморские мидии и рыбы.

Установленная контаминация черноморских гидробионтов наземными вирусами предполагала и возможное освоение ими новых хозяев – гидробионтов. Проведенный в лабораторных условиях эксперимент по адаптации бактериофагов фитопатогенных бактерий к миководорослям *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum* принципиально подтвердил возможность освоения наземными вирусами морской среды и гидробионтов. Таким образом, впервые доказано, что загрязнение наземными вирусами гидросферы, в частности Черного моря, несет потенциальную опасность не только для людей (при мелиорации, употреблении морепродуктов и пр.), но и для гидробионтов. На основании собственных результатов и литературных данных была предложена гипотеза о циркуляции вирусов между сушей и гидросферой, что в природе приводит к появлению “новых вирусов”, потенциально опасных для организмов суши и гидробионтов [1].

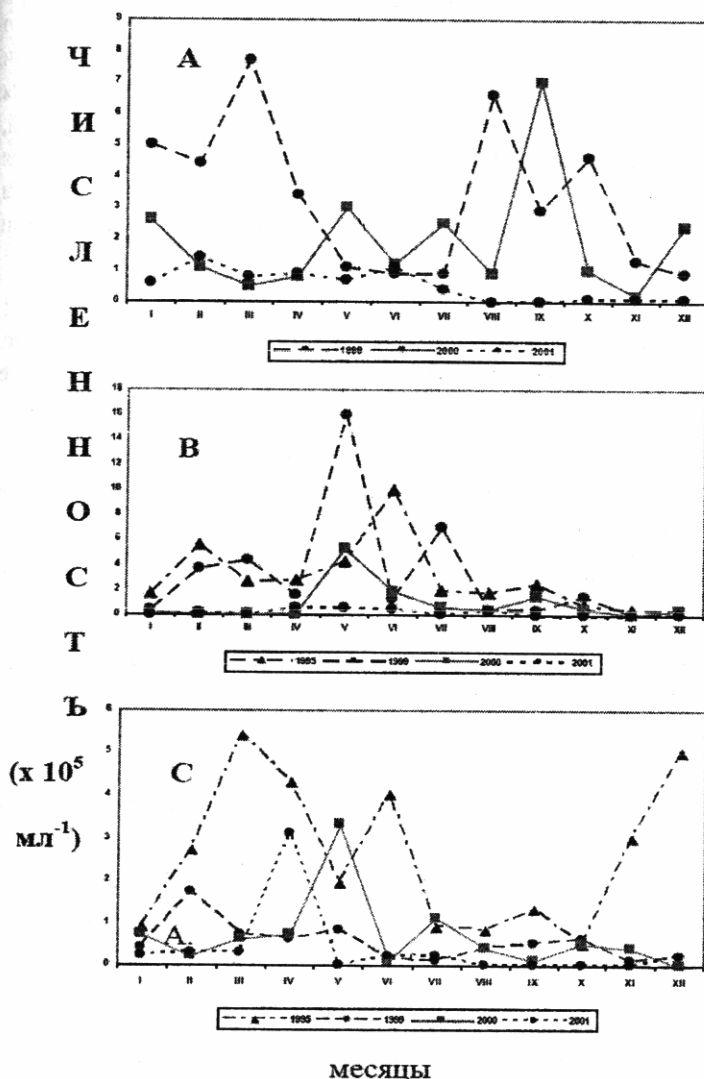


Рис. Численность представителей бактериопланктона – размерной фракции морского микропланктона более 0,45 мкм (А) и от 0,45 до 0,2 мкм (В) – и представителей виропланктона – размерной фракции морского микропланктона от 0,2 мкм до 0,05 мкм (С) в Севастопольской бухте в 1995, 1999–2001 гг.

Численность вирусов и бактерий в Севастопольской бухте (1995–2001 гг.) в виде графических изображений представлена на рисунке. Для вирусов были отмечены колебания численности от максимума 540000 (в марте 1995 г.) до минимума 300 (в мае и сентябре 2001 г.) вирусоподобных частиц (в.п.ч.) в 1 мл воды. Численность бактерий колебалась от 1600000 (в мае 1999 г.) до 300 (в сентябре–ноябре 2001 г.) клеток в 1 мл. Анализ численности морских бактерий и вирусов, проведенный с учетом международного индекса солнечной активности R_i (сведения из Национального геофизического центра, <http://sidc.oma.be/html/sunspot.html>) установил наличие средней отрицательной корреляции ($r=-0,6$ для вирусов с высоким уровнем значимости $P < 0,001$).

В микробентосе экологически благополучных бухтах Севастополя и побережья Крыма морфологическое разнообразие морских бактерий (как следствие разнообразие вирусов) выше и отмечено преобладание по численности вирусной фракции над бактериальной (численность бактерий 100000 – 48000000 клеток в 1 г грунта, вирусов 7000 – 6000000 в.п.ч. в 1 г грунта) [5]. Этот факт явился основанием для предложения использовать индекс соотношения числа вирусы/бактерии (virus-to-bacterium ratio) в микробентосе при комплексном экомониторинге водоемов.

За период 2002–2010 гг. были выделены и частично изучены новые для науки альговирусы *Tetraselmis viridis* (TvV), *Phaeodactylum tricornutum* (PtV), *Dunaliella viridis* (DvV) и *Prorocentrum pusilla* (PpV), которые поддерживаются в виде коллекции из более 100 вирусных штаммов. Геномный состав TvV и DvV изучается в рамках международной программы по проекту Gordon & Betty Moore Foundation Marine Phage, Virus, & Virome Sequencing Project (Broad Institute, MTI, USA, www.broadinstitute.org/annotation/viral/Phage). Поскольку альговирусы – индикаторы микроводорослей, которые, в свою очередь, являются индикаторными микроорганизмами при оценке качества окружающей среды, то изоляция альговирусов несет информацию не только о хозяине, но и о благополучии водоема. Поэтому поиск альговирусов предложено использовать при комплексном экомониторинге водоемов. Также поиск альговирусов может быть использован для изучения сезонности и географического распространения отдельных видов микроводорослей, учитывая ограниченную информацию в этом вопросе. Успешное использование альговирусов для определения вида неизвестной черноморской микроводоросли [7] явилось основанием для предложения применять набор известных альговирусов для тестирования и идентификации неизвестных микроводорослей.

Выводы

Таким образом, изучение вирусов в Крымского региона Черного моря в период 1994–2010 гг. позволило получить новые данные по биологии и экологии вирусов гидросферы, представляющие интерес не только в теоретическом, но и в практическом плане.

1. Бойко А.Л. Обмен вирусами суши и гидросферы – возможный путь их эволюции / Бойко А.Л., Степанова О.А. // Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ: Мат. 2-го Байкальского микробиол. симпоз. с междунар. участием. 10-15 сент. 2007. Иркутск. – Иркутск, 2007. – С. 27.
2. Крисс А.Е. Бактериофаг в море / Крисс А.Е., Рукина Е.А. // ДАН СССР. – 1947. – Т. 57, № 8. – С. 833–836.
3. Соловьев А.В. Явление освоения *in vitro* вирусами прокариотов с суши эукариотов-гидробионтов / А.В. Соловьев, О.А. Степанова, Е.А. Соловьева // Сборник Донецкого нац. ун-та. Сер. А. – 2008. – Вып. 2. – С. 431–433.
4. Степанова О.А. Адаптация бактериофагов *Xanthomonas axanopodis* к микроводоросли *Platymonas viridis* *in vitro* / О.А. Степанова // Вісн. Одес. нац. ун-ту. – 2004. – Т. 9, вып. 5. – С. 128–132.
5. Степанова О.А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря / О.А. Степанова – Севастополь: Мир, 2004. – 308 с.
6. Степанова О.А. Альговирусы как биоиндикаторы изменений в экологии акваторий Черного моря / О.А. Степанова // Совр. пробл. экологии Азово-Черноморского региона: Мат. IV межд. конф., 8-9 окт. 2008, Керчь, ЮгНИРО. – Керчь, 2008. – С. 82–86.
7. Степанова О.А. Определение вида микроводоросли с использованием альговируса [Электронный ресурс] / Степанова О.А., Галатанова О.А. // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: Мат. II Всеросс. конф. Сыктывкар, 5-9 окт. 2009. – Сыктывкар, 2009. – С. 33–34. – Режим доступа: http://ib.komisc.ru/add/conf/algo_2009/ свободный.
8. *Aquatic Viruses* // J. Marine Biological Association of the United Kingdom. – 2006. – Vol. 86, N 3. – P. 449–621.
9. Ecology of marine viruses / Banyuls-sur-mer, 19–22 March 2003. – Monaco, 2003. – 94 p. – (CIESM Workshop Monographs N21).
10. Proposal for SCOR WG to Investigate the Role of Viruses in Marine Ecosystems // Proceedings of the Scientific Committee on Oceanic Research. Venice, Italy, Sept. 2004. – Baltimore (USA), 2005. – Vol. 40. – P. 66–70.

О.А. Степанова

Інститут біології південних морів НАН України, Севастополь

ВІРУСИ В КРИМСЬКОМУ РЕГІОНІ ЧОРНОГО МОРЯ (РЕЗУЛЬТАТИ 1994–2010 рр.)

Встановлено контамінацію вірусами чорноморського середовища і гідробіонтів. Виявлено можливість *in vitro* алохтонних вірусів адаптуватися до гідробіонтів. Визначено чисельність вірусів і бактерій в мікропланктоні та в мікробентосі. З Чорного моря ізольовані та досліджені унікальні альговіруси до 4 видів мікроводоростей.

Ключові слова: алохтонні і автохтонні віруси, альговіруси, Чорне море

О.А. Stepanova

Institute of Biology of the Southern Seas of NAS of Ukraine, Sevastopol

VIRUSES ARE IN CRIMEAN REGION OF BLACK SEA (RESULTS 1994–2010)

It was discovered, that Black Sea environment and hydrobionts were contaminated by viruses brought from a land. The capability of viruses from a land to adapt to the hydrobionts was established (*in vitro*). The number of bacteria and viruses of microplankton and microbenthos was determined. New viruses to 4 algae species (more 100 viral strains) were isolated and studied.

Key words: allochthonous and indigenous viruses, algoviruses, Black sea

УДК 582.26/.27 (262.54)

Г.В. ТЕРЕНЬКО, М.А. ГРАНДОВА

Украинский научный центр экологии моря
Французский бульвар, 89, Одесса 65009

**СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ФИТОПЛАНКТОННОГО
СООБЩЕСТВА УКРАИНСКОГО СЕКТОРА АЗОВСКОГО МОРЯ
В ДЕКАБРЕ 2009 г.**

Впервые приведены результаты исследований зимнего фитопланктона украинской части Азовского моря. В зимний период найдено 55 видов микроводорослей. Выявлены обширные зоны моря, охваченные “цветениями” воды, вызванные массовым развитием диатомовых и синезеленых водорослей.

Ключевые слова: фитопланктон, “цветение” воды, пелагический альгоценоз, Азовское море

Азовское море – мелководный внутренний, относительно небольшой солоноватый бассейн, находящийся под сильным влиянием прибрежного стока, с которым в море попадает большое количество растворённых органических веществ. В настоящее время объём информации о зимней стадии сукцессии пелагического альгоценоза Азовского моря крайне ограничен и касается российской его части [2]. Информация относительно украинского участка моря вовсе отсутствует.

Цель настоящей работы – изучить видовой состав, количественные характеристики и основные закономерности хода зимней сукцессии фитопланктонного сообщества украинского сектора Азовского моря.

Материал и методы исследований

Материалом для работы послужили пробы фитопланктона, отобранные в районе украинской части Азовского моря в ходе 31 рейса НИС «Паршин» в декабре 2009 г. Всего было отобрано с 5 по 14 декабря 34 пробы фитопланктона на 17 станциях с двух горизонтов – поверхностного и придонного.

Пробы воды объёмом 1,5 дм³ концентрировали с помощью воронки обратной фильтрации с использованием ядерных (нуклеопоровых) фильтров с диаметром пор 1,5 мкм, сгущая пробу до объёма 50–60 мл, с последующей фиксацией 40%-ным нейтрализованным формалином. Количественный учёт клеток проводили в счетной камере Ножотта объёмом 0,05 мл под световым микроскопом.