УДК 578.4(262.5)

МОНИТОРИНГ АЛЬГОВИРУСОВ ЧЕРНОГО МОРЯ (2002 – 2015 гг.)

О.А. Степанова

Институт природно-технических систем
г. Севастополь, ул. Ленина, 28
E-mail:solar-ua@ya.ru

Приводятся результаты мониторинга в 2002 – 2015 гг. альговирусов Черного моря в Крымском регионе. Наблюдаемые изменения в частоте изоляции альговирусов, отражая ситуацию с их хозяевами – микроводорослями Tetraselmis viridis и Phaeodactylum tricornutum, применяемыми для экомониторинга, свидетельствуют об изменениях в экологии в бухтах Севастополя в 2008 г. и в 2015 г.

Введение. Морская вирусология получила свое бурное развитие 40 – 50 лет тому назад, чему способствовало использование электронной микроскопии (ЭМ) для прямого счета вирусов в пробах воды из гидросферы [1]. Также для этих целей применяется эпифлуоресцентная микроскопия (ЭФМ) с флуорохромными красителями, нацеленными на окраску нуклеиновых кислот рассматриваемых объектов. Результаты ЭМ и ЭФМ вполне сопоставимы [2, 3], поэтому метод ЭФМ широко используют в изучении экологии водных вирусов. Впервые с помощью ЭФМ была изучена и численность представителей виропланктона и виробентоса Черного моря в 1995 – 2001 гг. При этом была установлена корреляция между численностью морских микроорганизмов – бактерий и вирусов и некоторыми экологическими факторами, в т.ч. геогелиофизическими [4 – 7]. Для экомониторинга был предложен индекс соотношения числа вирусов и бактериий в микробентосе.

Наши дальнейшие исследования были посвящены поиску, изоляции и мониторингу отдельных представителей сообщества черноморских вирусов – альговирусов, выполняющих важную роль в регулировании и поддержании динамики численности фитопланктона. Представители фитопланктона – микроводоросли чутко реагируют своими характеристиками на изменения в экологии среды обитания, что естественным образом будет отражаться на альговирусах.

Целью настоящей работы является анализ результатов многолетнего мониторинга черноморских альговирусов и оценка изменений в структуре альговирусной составляющей на примере альговирусов микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum*, отличающихся по требовательности к условиям среды обитания и по устойчивости к экологическим факторам.

Материалы и методы. При мониторинге черноморских альговирусов с использованием авторских методик [8, 9] изучали морскую воду, материал от мидии *Mytilus galloprovincialis* и жабры от рыб. Отбор проб проводили из бухт Севастополя и из акватории Крымского полуострова с 2002 по 2015 гг. Места отбора проб и особенности подготовки материала для исследований описаны [5, 10 – 12]. В качестве чувствительных для изоляции альговирусов микроводорослей использовали жидкие культуры *Tetraselmis viridis, Dunaliella viridis, Phaeodactylum tricornutum, Prorocentrum pusillum, Isochrysis galbana* и *Emiliania huxleyi* из коллекции микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей Института биологии южных морей.

Результаты и обсуждение. Всего за период 2002 – 2015 гг. было изучено более 500 проб, что отражено в табл. 1. Было изолировано свыше 200 вариантов новых для науки альговирусов микроводорослей *T.viridis* (TvV), *P.tricornutum* (PtV), *D.viridis* (DvV), *P.pusilla* (PpV), *I.galbana* (IgV) и нового для экосистемы Черного моря альговируса *E.huxleyi* (EhV). Свойства черноморских альговирусов описаны [5, 10 – 13].

Как видно из данных, представленных в табл. 1, изоляция альговирусов из мидий для каждого вида микроводорослей была более успешной, чем из проб морской воды. Этот факт обусловлен концентрацией вирусов из окружающей среды, благодаря фильтрующим способностям моллюсков. Однако отбор проб морской воды менее сложен, поэтому и чаще использовался.

Таблица 1

Результаты изоляции альговирусов *Tetraselmis viridis* (TvV), *Dunaliella viridis (*DvV), *Phaeodactylum tricornutum* (PtV), *Prorocentrum pusillum* (PpV), *Isochrysis galbana* (IgV) и *Emiliania huxleyi* (EhV) из разных станций акватории Севастополя и Крымского полуострова (май 2002 г. – июнь 2015 г.) в зависимости от вида исследуемого материала

Исследуемый материал (пробы)	Количество проб/изолированных альговирусов, % положительных на наличие альговирусов проб							
	(TvV+PtV)				DvV	PpV	IgV	EhV
	2002 – 2006 гг.	с 2007 г. по сентябрь 2011 г.	с октября 2011 г. по сентябрь 2012 г.	январь – июнь 2015 г.	2008 – 2012 гг.	2010 – 2013 гг.	2012 – 2013 гг.	с 2014 г. по февраль 2015 г.
жабры рыб	107/8 (8+0) 7.5% (7.5% + 0%)	8/0 0%	не изучали	не изучали	не изучали	не изучали	не изучали	не изучали
мидии	11/8 (6+2) 72.7% (54.5%+18.2%)	41/18 (2+16) 43.9% (4.9% + 9.0%)	4/3 (2+1) 75.0% (50%+25%)	не изучали	36/18 50.0%	23/5 21.7%	10/7 70.0%	1/1 100%
вода	66/38 (16+22) 57.5% (24.2%+33.3%)	165/32 (6+26) 19.4% (3.6%+15.8%)	22/10(4+6) 45.5% (18.2%+27.3%)	16/7(7+0) 43.8% (43.8%+0)	141/21 14.9%	108/15 13.9%	52/14 26.9%	18/14 77.8%
итого, % изоляции	184/54 (30+24) 29.3% (16.3%+13.0%)	214/50 (8+42) 23.3% (3.7%+19.6%)	26/13(6+7) 50% (23.1%+26.9%)	16/7(7+0) 43.8% (43.8%+0)	177/39 22.0%	131/20 15.3%	62/21 33.9%	19/15 78.9%

Было отмечено, что в период 2002 – 2006 гг. процент (частота) изоляции из всех изучаемых проб TvV (16.3%) незначительно превышал процент изоляции PtV (13%), что было принято за фоновые показатели. В период 2007 – 2011 гг. картина иная – в 5 раз чаще изолировали PtV, хотя отличия с фоновыми показателями наблюдались в основном в частоте изоляции TvV.

В 2012 г. общая (суммарная) частота изоляции TvV и PtV из изучаемых проб увеличивалась почти в 2 раза (50%) по сравнению с периодом 2007 – 2011 гг. (23.3%) и 2002 – 2006 гг. (29.3%). Увеличение происходило как за счет выделения PtV (в 6 раз по сравнению с 2007 – 2011 гг.), так и TvV (в 2 раза по сравнению с 2002 – 2006 гг.).

В период первого полугодия 2015 г. процент изоляции TvV был максимальным (43.8%) по сравнению с другими временными периодами, а вирус микроводоросли *P.tricornutum* изолирован не был.

Полученные результаты мониторинга альговирусов с 2002 по 2015 гг. могут свидетельствовать о существенных изменениях в структуре и численности черноморского фитопланктона. Сравнивая результаты мониторинга альговирусов в 2002 – 2006 гг. (фоновые показатели) с остальными временными периодами, можно отметить, что в 2007 – 2011 гг. вероятно было снижение численности микроводоросли *T.viridis*, а в 2015 г. – снижение численности *P.tricornutum.* Сдвиги в сторону повышения численности микроводорослей *T.viridis* и *P.tricornutum* в акватории Черного моря в Крымском регионе по данным мониторинга альговирусов были вероятны в промежуток времени с октября 2011 по декабрь 2012 гг.

Эти изменения в составе и структуре фитопланктона могут быть вызваны глобальными или региональными экологическими факторами, в т.ч. изменениями климата, активностью Солнца, усилением доли УФ радиации или антропогенным воздействием. По данным литературы известно, что микроводоросли *T.viridis* и *P.tricornutum*, отличающиеся противоположной устойчивостью к различным загрязнениям и иным экологическим факторам и условиям среды обитания, являются часто используемыми индикаторами для оценки экологической ситуации в акватории [14 – 17]. Любые изменения в численности этих микроводорослей отразятся на частоте изоляции их вирусов. Поэтому логично утверждать, что изменения в частоте изоляции альговирусов свидетельствуют как об изменениях ситуации с их хозяевами, чутко реагирующими на изменения условий обитания, так и об экологической ситуации. Иными словами, сдвиги в частоте изоляции альговирусов сигналят об экологических изменениях в среде их обитания.

Исследования по оценке результатов мониторинга альговирусов, хозяевами которых являются микроводоросли, используемые в экомониторинге в качестве тестовых или индикаторных организмов, проводятся нами впервые с 2002 г. В литературе сведений о мониторинге альговирусов не обнаружено. Вероятно, это связано со сложностью используемых зарубежными коллегами для изоляции альговирусов методик, отличающихся громоздкими объемами (500 – 3000 мл) индикаторных культур и многомесячными процедурами пассирования, накопления и очистки вирусологического материала. Наши разработанные и запатентованные методики изоляции альговирусов отличаются простотой, экономичностью, специфичностью и высокой чувствительностью, что позволяет проводить многолетний мониторинг альговирусов. Основное условие проведения методик – наличие проб воды (или материала от гидробионтов) и стерильной лабораторной посуды (пипетки, пробирки, колбы и др.), что всегда имеется даже в самой мало оснащенной лаборатории биологического профиля, обладающей небольшой коллекцией культур микроводорослей.

Для более объективной оценки результатов мониторинга TvV и PtV, изоляцию которых проводили из разных проб из бухт Севастополя и из акватории Крымского полуострова, был выполнен анализ их поиска из проб воды Севастопольской, Мартыновой и Карантинной бухт (как стабильной пространственной характеристики) за период времени 2002

– 2015 гг. (переменная характеристика времени). Полученные при этом данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что максимальный процент изоляции TvV из проб воды наблюдался в 2002 – 2003 гг. (54%), и близкие к максимуму значения (44%) отмечены в 2006 г. и в 2015 г.

Таблица 2

Сравнительные результаты изоляции альговируса *Tetraselmis viridis* (TvV) и *Phaeodactylum tricornutum* (PtV) из проб морской воды 3-х бухт (Севастопольская, Карантинная, Мартынова) в разные годы с 2002 по 2015 гг.

Количества проб и вирусов в абсолютных величинах и в %	Временные периоды (годы)									
	2002-2003	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2015
Количество проб воды	13	23	9	14	31	30	22	15	21	16
Число изолятов TvV/ PtV	7/3	4/5	4/1	-/2	1/14	1/4	2/3	1/2	2/5	7/-
% изоляции из проб TvV/ PtV	54%/ 23%	17%/ 22%	44%/ 11%	0%/ 14%	3%/ 45%	3%/ 13%	9%/ 14%	7%/ 13%	10%/ 24%	44%/ 0%

Обозначения: (-) – отрицательный результат (вирус из пробы изолирован не был).

Минимальный процент изоляции TvV (0 – 3%) отмечен в 2007, 2008 и 2009 гг.

Максимальный процент изоляции PtV (45%) наблюдали в 2008 г., а минимальный (0%) в 2015 г.

По данным анализа мониторинга альговирусов в трех бухтах Севастополя логично предположить, что в структуре черноморского фитопланктона происходили изменения со снижением микроводоросли *T.viridis* в 2007 – 2009 гг. и представителей *P.tricornutum* в 2015 г. Причем это предположение, хотя и незначительно отличается, но не противоречит заключениям, сделанным по данным табл. 1.

Максимум изоляции PtV в 2008 г. совпадает с минимальными значениями процента изоляции TvV. Т.к. микроводоросль *P.tricornutum* обладает требовательностью к условиям среды обитания, а максимум изоляции PtV свидетельствует о высокой концентрации этой микроводоросли в изучаемой акватории, то логично предположить и об относительном благополучии экологической ситуации в 2008 г. в бухтах Севастополя.

Однако отсутствие PtV в пробах воды в 2015 г. может свидетельствовать об изменениях экологической ситуации, угнетающих чувствительную и требовательную к условиям обитания микроводоросль. Этими угнетающими факторами могут быть как глобальные, так и региональные изменения в экологии.

Заключение. Мониторинг черноморских альговирусов в 2002 – 2015 гг. позволил изолировать из проб воды и гидробионтов бухт Севастополя и акватории Черного моря Крымского региона свыше 200 вариантов новых для науки альговирусов к микроводорослям *T.viridis, D.viridis, P.tricornutum, P.pusilla, I.galbana* и нового для экосистемы Черного моря альговируса *E.huxleyi*.

На протяжении 2002 – 2015 гг. наблюдались изменения в частоте изоляции альговирусов *T.viridis* и *P.tricornutum*, что отражает ситуацию с их хозяевами – отличающимися по чувствительности к экологической ситуации микроводорослями, а следовательно и с большой вероятностью свидетельствует об экологическом благополучии в 2008 г. и об ухудшении экологической ситуации в бухтах Севастополя в 2015 г., что может быть вызвано как глобальными, так и региональными экологическими факторами, в т.ч. и изменениями климата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sieburth J.McN., Smetacek V., Lenz J.* Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartmens of the plankton and their relationships to plankton size fractions // Limnol. Oceanogr. – 1978. – 23, N6. – P. 1256–1263.
2. *Borsheim K., Bratbak G., Heldal M.* Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy // Appl. and Environ Microbiol. – 1990. – – 56, N2. – P. 352–356.
3. *Hara S., Terauchi K., Koike I.* Abundance of viruses in marine waters: Assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – 57, N9. – P. 2731–2734.
4. *Степанова О.А.* Морские бактерии и вирусы в воде и донных осадках бухт Севастополя // Экология. – 2001. – № 1. – С. 61–63.
5. *Степанова О.А.* Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря. – Севастополь: Мир "ЭКС-ПРЕСС ПЕЧАТЬ". – 2004. – 308 с.
6. *Степанова О.А.* Некоторые сведения о виропланктоне и его отдельных представителях // Успехи современной биологии. – 2005. – 125, № 6. – С. 543–555.
7. *Степанова О.А., Пантелеева Г.Г.* Морские бактерии и вирусы и солнечная активность // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа: сб. науч. тр. – Севастополь. – 2005. – Вып. 12. – С. 632–636.
8. *Степанова О.А.* Спосіб ізоляції альговірусів мікроводорості *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) з проб морської води Пат. 97293 C2 UA, МПК C12N 1/12 / (UA); Бюл. № 2, 2012.
9. *Степанова О.А.* Спосіб ізоляції альговірусів однокілтинних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita). Деклараційний патент на винахід 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12. Бюл.N4 // Промислова власність. – 2004. – N4. – С. 1–4.
10. *Шоларь С.А., Степанова О.А.* Изоляция альговирусов из черноморской среды у побережья Севастополя (2002 – 2010 гг.) // Биология внутренних вод: Материалы XIV Школы-конференции молодых учёных (Борок, 26–30 октября 2010 г.). – Ярославль: Принтхаус, 2010. – С. 183–190.
11. *Степанова О.А.* Вирусы в Крымском регионе Черного моря (результаты 1994 – 2010 гг.) // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер.Біол. – 2010. – №3 (44). – С. 271–275.
12. *Степанова О.А.* Результаты поиска альговируса *Isochrysis galbana* (2012 –2013 гг.), как отражение экологии этой водоросли в экосистеме Черного моря в бухтах Севастополя / Сб. матер. докл. III Междунар. науч. конф. «Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге», 24–29 августа 2014 г. / Институт внутренних вод им. И.Д. Папанина. – Ярославль: Филигрань, 2014. – С. 106–107.
13. *Степанова О.А., Бойко А.Л., Щербатенко И.С.* Компьютерный анализ геномов трех морских альговирусов // Микробиологический журнал. – 2013. – Т. 75, № 5. – С. 76–81.
14. *Дятлов С.У., Петросян А.Г. Phaeodactylum tricornutum* Bohl. (Chrysophyta) как тест-объект. Общие положения // Альгология. – 2001. – 11, № 1. – С. 145–154.
15. *Кузьминова Н.С.* Действие хозяйственно-бытовых сточных вод на некоторых представителей морских микроводорослей отдела *Chlorophyta* // Материалы междунар. научно-практич. конф. молодых ученых. (Киев, 25–28 февраля 2002 г.). – Киев, 2002. – С. 157–158.
16. *Маркина Ж.В., Айздайчер Н.А.* Содержание фотосинтетических пигментов, рост и размер клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* при загрязнении среды медью // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 3. – С. 343–347.
17. *Round F.E.* The biology of Algae. London: Edward Arnold. – 1965. – 269 p.