

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ЧЕРНОМОРСКИХ АЛЬГОВИРУСОВ В БУХТАХ СЕВАСТОПОЛЯ И КРЫМА (2002–2018 ГГ.)

О.А. Степанова

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

За период с мая 2002 г. по май 2018 г. из разных проб (морской воды и материала от гидробионтов), отобранных из бухт Севастополя и Крыма, с помощью запатентованных авторских методик были изолированы новые для науки альговирuses морских микроводорослей *Tetraselmis viridis* (TvV), *Dunaliella viridis* (DvV), *Phaeodactylum tricorutum* (PtV), *Prorocentrum pusillum* (PpV), *Isochrysis galbana* (IgV), *Tisochrysis lutea* (TlV). Также были выделены новые для экосистемы Черного моря штаммы альговируса микроводоросли *Emiliana huxleyi* (EhV) и цианофага к культуре цианобактерии *Synechococcus* (ScV). Всего из 962 изученных проб, отбирившихся с разной регулярностью, был выделен 271 штамм вирусом, среди которых 71 TvV, 96 PtV, 39 DvV, 20 PpV, 21 IgV, 15 EhV, 3 ScV и 6 TlV.

Ключевые слова: альговирuses, цианофаги, микроводоросли, бухты Севастополя и Крыма, Черное море, экологическое благополучие.

Поступила в редакцию: 28.06.2018.

Введение. Молодая наука – морская (водная) вирусология, бурно развивающаяся с конца 20 века, преподносит исследователям все новые факты, свидетельствующие о наиважнейшей роли вирусом гидросферы в глобальной экологии нашей Планеты [1–3]. На острие интересов ученых остается проблема поиска, выделения и изучения новых для науки вирусом водоемов, причем особый интерес в этом направлении представляют альговирuses, поскольку значение их хозяев – микроводорослей – с учетом их роли в циркуляции CO₂ и O₂, в продукции первичного органического вещества и в других процессах в природе переоценить сложно.

Мониторинг новых для науки или для экосистемы Черного моря альговирусом в бухтах Севастополя и Крыма проводится с мая 2002 г. с помощью запатентованных авторских методик [4, 5].

До 2014 г. поиск черноморских альговирусом выполнялся на базе Института биологии южных морей (ИнБИОМ), ныне Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского (ИМБИ). С 2015 г. работы были продолжены в Институте природно-технических систем (ИПТС) (г. Севастополь).

Целью настоящей работы является анализ и обобщение результатов, полу-

ченных при многолетнем мониторинге (2002–2018 гг.) черноморских альговирусом в бухтах Севастополя и Крыма.

Материалы и методы. Отбор проб морской воды, мидий *Mytilus galloprovincialis* и рыб разных видов проводили как из закрытых, так и из открытых бухт южного и юго-западного Крыма, в т.ч. из бухт Севастополя с 2002 по 2018 гг. Наиболее регулярно отбирали пробы морской воды из трех бухт Севастополя: Карантинной, Мартыновой и Артиллерийской.

Места отбора проб, особенности подготовки материала для исследований и результаты в ходе изучения черноморских альговирусом описаны ранее [6–12]. Для изоляции альговирусом по авторским запатентованным методикам [4, 5] использовали жидкие культуры микроводорослей *Tetraselmis viridis*, *Dunaliella viridis*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Prorocentrum pusillum*, *Isochrysis galbana*, *Emiliana huxleyi*, *Tisochrysis lutea*, а также культуру цианобактерий *Synechococcus* (BS 9001 4/М). Культуры были получены из коллекции микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ и ИМБИ.

Результаты и их обсуждение. За период с мая 2002 г. по май 2018 г. из разных проб (морской воды, мидий и рыб)

было изолировано около 300 штаммов новых для науки альговирусов морских микроводорослей *T. viridis* (TvV), *D. viridis* (DvV), *P. tricorutum* (PtV), *P. pusillum* (PpV), *I. galbana* (IgV), *T. lutea* (TlV). В т.ч. были выделены новые для экосистемы Черного моря штаммы альговируса микроводоросли *E. huxleyi* (EhV) и цианофага к культуре цианобактерии *Synechococcus* (ScV). Полученные результаты по изоляции штаммов черноморских альговирусов и цианофага цианобактерии *Synechococcus* представлены в табл. 1 и 2.

Сведения о результатах поиска и изоляции новых для науки черноморских альговирусов микроводорослей *T. viridis* и *P. tricorutum* в период с 2002 по 2018 гг. отражены в табл. 1. Микроводоросли *T. viridis* и *P. tricorutum* при экомониторинге учитываются исследователями как индикаторы экологического благополучия акваторий [13–16]. Поскольку изоляция альговирусов подтверждает присутствие в воде и их хозяев, то в наших работах альговирусы микроводорослей *T. viridis* и *P. tricorutum* также учитываются как индикаторы экологического благополучия [6, 7, 9, 17].

Всего из 517 различных проб было изолировано 167 штаммов альговирусов к двум индикаторным в отношении экологического благополучия микроводорослям, что составляет 32,3% от числа изученных проб. Причем изоляция этих альговирусов из материала от черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* составляет 53,5%, т.е. более чем каждая вторая проба содержала альговирусы микроводорослей *T. viridis* или *P. tricorutum*. Эти данные свидетельствуют, что материал от мидий является наиболее контаминированным вирусами моря, что связано с особенностями физиологии этих моллюсков-фильтраторов.

Частота изоляции TvV и PtV, выражаемая в процентах по отношению к числу изученных проб, в среднем за весь период 2002–2018 гг. отличалась незначительно – 13,7% и 18,6% соответственно. В период с января 2007 по сентябрь 2011 гг. отмечается самая низкая частота их изоляции – 23,3% из всех проб, причем в этот же период фиксируется и самая низкая частота изоляции у TvV – 3,7%.

Максимальная частота изоляции этого вируса приходится на 2015 г. (52%), при этом для PtV отмечается минимальная частота изоляции – 0%, что свидетельствует о резком снижении численности требовательной к условиям среды микроводоросли *P. tricorutum*. Ситуация увеличения численности устойчивой к экологическому неблагополучию микроводоросли *T. viridis*, косвенно определяемая по высокой частоте изоляции TvV, при резком снижении численности требовательной к условиям среды микроводоросли *P. tricorutum* (0% изоляции PtV) дает основание утверждать, что в 2015 г. в экосистеме Черного моря в бухтах Севастополя сложилась неблагоприятная экологическая обстановка.

В 2018 г. за период с января по май частота изоляции альговирусов свидетельствует об относительном экологическом благополучии – 53,3% изоляции у PtV при 13,3% у TvV. Дальнейшие исследования, направленные на поиск и изоляцию TvV и PtV в 2018 г. прояснят ситуацию в отношении экологического благополучия в бухтах Севастополя в этом году.

Мониторинг вирусов гидросферы, как одной из наиболее чувствительной к факторам среды биосистемы, логично использовать в качестве одного из экологических индикаторов, поиск и утверждение которых на современном этапе решения проблем устойчивого развития не теряет своей актуальности [18]. Поскольку с этих позиций вирусы гидросферы рассмотрены еще не были, предлагается более широко использовать мониторинг альговирусов индикаторных к экологической ситуации микроводорослей *T. viridis* и *P. tricorutum*, что повысит качество и упростит проведения экомониторинга акватории Черного моря.

В табл. 2 отражена информация о поиске и изоляции в 2008–2018 гг. новых для науки или для экосистемы Черного моря альговирусов микроводорослей *D. viridis*, *P. pusillum*, *I. galbana*, *E. huxleyi*, *T. lutea* и цианофага цианобактерии *Synechococcus*.

Всего за период 2008–2018 гг. из 445 проб морской воды и черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis* было изолировано 104 штамма вирусов к пяти видам микроводорослей и к цианобактерии

Таблица 1. Результаты поиска и изоляция новых для науки черноморских альговирусов к двум видам микроводорослей *Tetraselmis viridis* (TvV) и *Phaeodactylum tricornutum* (PtV) в период с мая 2002 по май 2018 гг.

Пробы	Количество проб/изолированных вирусов, % положительных на наличие вирусов проб							
	(TvV+PtV)							
	2002 – 2006 гг.	с января 2007 по сентябрь 2011 гг.	с октября 2011 по октябрь 2012 гг.	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г. (январь – май)	Итого, % изоляции
жабры рыб	107/8 (8+0) 7.5% (7.5% + 0%)	8/0 0%	не изучали	не изучали	не изучали	не изучали	не изучали	108/8(8+0) 7.4% (7.4%+0%)
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	2/2(1+1) 100% (50%+50%)	не изучали	не изучали	58/31(11+20) 53.5% (19,0%+34,5%)
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%)	25/13(13+0) 52% (52%+0%)	21/11(8+3) 52% (38%+14%)	30/14(3+11) 46,7% (10%+36.7%)	15/10 (2+8) 66.6% (13.3%+53.3%)	344/128(52+76) 37.2% (15.1%+22.1%)
Итого, % изоля- ции	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%)	25/13(13+0) 52% (52%+0%)	23/13(9+4) 56.5% (39.1%+17.4%)	30/14(3+11) 46,7% (10%+36.7%)	15/10 (2+8) 66.6% (13.3%+53.3%)	517/167(71+96) 32.3% (13.7%+18,6%)

Таблица 2. Результаты поиска и изоляция (2008–2018 гг.) новых для науки или для экосистемы Черного моря альговирусов микроводорослей *Dunaliella viridis* (DvV), *Prorocentrum pusillum* (PpV), *Isochrysis galbana* (IgV), *Emiliania huxleyi* (EhV), *Tisochrysis lutea* (TlV) и панофага *Synechococcus* (ScV)

Пробы	Количество проб/изолированных вирусов, % положительных на наличие вирусов проб						
	DvV 2008 – 2012 гг.	PpV 2010 – 2013 гг.	IgV 2012 – 2013 гг.	EhV 2014 по февраль 2015 гг.	ScV 2016 г.	TlV с октября 2016 по май 2018 гг.	Итого, % изоляции
мидии	36/18 50.0%	23/5 21.7%	10/7 70.0%	1/1 100%	не изучали	не изучали	70/31 44.3%
вода	141/21 14.9%	108/15 13.9%	52/14 26.9%	18/14 77.8%	9/3 33.3%	47/6 12.8%	375/73 19.5%
Итого, % изоля- ции	177/39 22.0%	131/20 15.3%	62/21 33.9%	19/15 78.9%	9/3 33.3%	47/6 12.8%	445/104 23.4%

Synechococcus. Данные, представленные в табл. 2, также свидетельствуют, что наибольшая частота изоляции альговирюсов наблюдается из материала от мидий – 44,3%, что незначительно отличается от 53,5% для вирусюв микроводорослей *T. viridis* и *P. tricorнутum* (см. табл. 1). Однако частота изоляции альговирюсов микроводорослей *D. viridis*, *P. pusillum*, *I. galbana*, *E. huxleyi*, *T. lutea* и штаммов цианофага цианобактерии *Synechococcus* из проб морской воды в 2 раза ниже (19,5%), чем у вирусюв микроводорослей *T. viridis* и *P. tricorнутum* (37,2%).

Заключение. На основании анализа и обобщения результатов поиска и изоляции черноморских альговирюсов и цианофагов из бухт Севастополя и Крыма в период 2002–2018 гг. было установлено следующее:

– всего из 962 проб (морской воды и материала от гидробионтов), отбирившихся с разной регулярностью, были выделены новые для науки или для экосистемы Черного моря вирусюв в количестве 271 штамма;

– среди 271 штамма выделенных вирусюв - 71 TvV, 96 PtV, 39 DvV, 20 PpV, 21 IgV, 15 EhV, 3 ScV и 6 TIV;

– наиболее часто (в среднем до 53,5%) альговирюсы были изолированы из материала от черноморских мидий *Mytilus galloprovincialis*, что указывает на возможность использования мидий в качестве изучаемых (мониторинговых) объектов для поиска и изоляции альговирюсов;

– частота изоляции альговирюсов двух индикаторных к экологическому благополучию микроводорослей *T. viridis* и *P. tricorнутum* за период 2002–2018 гг. свидетельствует об ухудшении экологической ситуации в акватории Крыма и Севастополя в 2015 г.;

– мониторинг черноморских альговирюсов, как одной из чувствительных к факторам среды биосистемы, предлагается использовать в качестве одного из экологических индикаторов, поиск и утверждение которых на современном этапе решения проблем устойчивого развития не теряет своей актуальности.

Работа выполнена по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2016-0008 “Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод», руководитель направления – д.т.н., профессор Гайский В.Н.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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. (Annex 4).

2. Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // Nature Reviews Microbiology. 2007. No 5. P. 801–812.

3. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. and Molec. Biol. Reviews. 2000. Vol. 64, No 1. P. 69–114.

4. Декларационный патент на изобретение 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів однокілтних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita) / О.А. Степанова (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № 2003065499; заявл. 13.06.2003; опубл. 15.04.2004. Бюл. № 4.

5. Патент 97293 C2 UA, МПК C12N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів микроводорості *Phaeodactylum tricorнутum* (Bacillariophyta) з проб морської води / О.А. Степанова (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № а201003881; заявл. 06.04.2010; опубл. 25.01.2012. Бюл. 2012. № 2.

6. Степанова О.А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусюв Черного моря. Севастополь: Мир “ЭКСПРЕСС ПЕЧАТЬ”. 2004. 308 с.

7. Степанова О.А. Вирусюв в Крымском регионе Черного моря (результаты 1994 – 2010 гг.) // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. 2010. № 3 (44). С. 271–275.

8. Степанова О.А. Результаты поиска альговируса *Isochrysis galbana* (2012 – 2013 гг.), как отражение экологии этой водоросли в экосистеме Черного моря в бухтах Севастополя // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: сб. матер. докл. III Междунар. науч. конф., Институт внутренних вод им. И.Д. Папанина (24–29 августа 2014 г.). Ярославль: Филигрань. 2014. С. 106–107.
9. Степанова О.А. Черноморские альговирусы // Биология моря. 2016. Т. 42. № 2. С. 99–103.
10. Степанова О.А., Бойко А.Л., Щербатенко И.С. Компьютерный анализ геномов трех морских альговирусов // Микробиологический журнал. 2013. Т. 75. № 5. С. 76–81.
11. Степанова О.А., Стельмах Л.В. Поиск и изоляция нового альговируса микроводоросли *Tisochrysis lutea* из экосистемы Черного моря в бухтах Севастополя (Крымский регион) // Экосистемы. 2017. Вып. 12 (42). С. 28–34.
12. Шоларь С.А., Степанова О.А. Изоляция альговирусов из черноморской среды у побережья Севастополя (2002 – 2010 гг.) // Биология внутренних вод: материалы XIV Школы-конф. молодых учёных (Борок, 26–30 октября 2010 г.). Ярославль: Принтхаус, 2010. С. 183–190.
13. Дятлов С.У., Петросян А.Г. *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. (Chryso-phyta) как тест-объект. Общие положения // Альгология. 2001. Т. 11. № 1. С. 145–154.
14. Кузьминова Н.С. Действие хозяйственно-бытовых сточных вод на некоторых представителей морских микроводорослей отдела *Chlorophyta* // Проблемы аквакультуры и функционирования водных экосистем: материалы Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых. (25–28 февраля 2002 г.). Киев. 2002. С. 157–158.
15. 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.
16. Round F.E. The biology of Algae. London: Edward Arnold. 1965. 269 p.
17. Степанова О.А. Мониторинг альговирусов Черного моря (2002–2015 гг.) // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2015. Вып. 1 (21). С. 103–107.
18. Степанова О.А. Ответные реакции вирусов гидросферы и их одноклеточных хозяев на экологические факторы // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 12 (32). С. 99–108.

MONITORING RESULTS OF THE BLACK SEA ALGAL VIRUSES FROM THE BAYS OF SEVASTOPOL AND OTHER CRIMEAN BAYS (2002–2018)

O.A. Stepanova

Institute of Natural and Technical Systems,
Russian Federation, Sevastopol, Lenin St., 28

During the period from May 2002 to May 2018 from different samples (marine water, material from hydrobionts), taken from the bays of Sevastopol and other Crimean bays, new for science algal viruses of marine microalgae *Tetraselmis viridis* (TvV), *Dunaliella viridis*, *Phaeodactylum tricornutum* (PtV), *Prorocentrum pusillum* (PpV), *Isochrysis galbana* (IgV), *Tisochrysis lutea* (TlV) were isolated. Also new viral strains of *Emiliania huxleyi* (EhV) and cyanophage for the culture of the cyanobacterium *Synechococcus* (ScV) for the Black Sea ecosystem were isolated. In total, from 962 studied samples, which were selected with different regularities, 271 strains of viruses were isolated, among them 71 TvV, 96 PtV, 39 DvV, 20 PpV, 21 IgV, 15 EhV, 3 ScV and 6 TlV.

Keywords: algal viruses and cyanophages, microalgae, bays of Sevastopol and other Crimean bays, Black Sea, ecological well-being (good ecological state).