

УДК 578.4(262.5)

## ПОИСК И ИЗОЛЯЦИЯ НОВОГО АЛЬГОВИРУСА МИКРОВОДОРОСЛИ *TISOCHRYSIS LUTEA* ИЗ ЭКОСИСТЕМЫ ЧЕРНОГО МОРЯ В БУХТАХ СЕВАСТОПОЛЯ (КРЫМСКИЙ РЕГИОН)

Степанова О. А.<sup>1</sup>, Стельмах Л. В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт природно-технических систем, Севастополь, Россия, solar-ua@ya.ru

<sup>2</sup> Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского, Севастополь, Россия, lustelm@mail.ru

Впервые из бухт Севастополя в 2016–2017 годах были выделены и частично изучены пять штаммов нового для науки альговируса микроводоросли *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert (Haptophyta). Изоляция данного альговируса из экосистемы Черного моря свидетельствует о возможном присутствии микроводоросли *Tisochrysis lutea* в изучаемых акваториях.

*Ключевые слова:* альговирус микроводоросли *Tisochrysis lutea*, экосистема Черного моря.

### ВВЕДЕНИЕ

Вирусы водоемов, в том числе морские вирусы, выполняют важную, но пока недостаточно изученную роль в функционировании водных экосистем. Понимание роли вирусов в циркуляции органического вещества в Мировом океане, в процессах трансформации органического вещества по пищевым цепям и в биоразнообразии является основой для оценки стабильности морских систем и их биогеохимической значимости, увеличивая предсказуемость воздействий глобальных изменений на биогеохимические процессы в море (Proposal ..., 2005). И при этом ученые сходятся во мнении, что морские вирусы играют важную роль в глобальной экосистеме (Suttle, 2007).

Среди морских вирусов альговирусы представляют особый интерес для исследователей, поскольку вызывают лизис первичных продуцентов органической материи – микроводорослей, составляющих основу фитопланктона, ответственного за циркуляцию углекислого газа и кислорода, как в гидросфере, так и в атмосфере (Wommack, Colwell, 2000). Некоторые виды, например кокколитофорида *Emiliana huxleyi* (Lohmann) W.W.Nau & H.P. Mohler, производят диметилсульфид. Под действием вирусов данная кокколитофорида разрушается и выделяет в среду диметилсульфид, который способствует образованию облаков, а, следовательно, влияет на климат нашей планеты (Tyrrel, Merico, 2004).

Поиск, изоляция и изучение биологии и экологии альговирусов из экосистемы Черного моря проводятся с 2002 года. До 2015 года мониторинг черноморских альговирусов выполнялся на базе Института биологии южных морей (ныне Институт морских биологических исследований – ИМБИ), с 2015 года и по настоящее время работы продолжают в Институте природно-технических систем (ИПТС). В 2002–2017 годах из различных проб из экосистемы Черного моря было изолировано около 300 штаммов в основном новых для науки вирусов к разным видам морских микроводорослей (Степанова, 2016). Изучение геномов трех штаммов черноморских альговирусов было проведено в Broad Institute of MIT USA в соответствии с «Gordon & Betty Moore Foundation Marine Phage, Virus, & Virome Sequencing Project» (2009–2010). Информация о геномных и мета данных черноморских альговирусов представлена в NCBI и CAMERA. Геномы вирусных штаммов TvV-S20, TvV-S11 и DvV-S12 были депонированы как G2351, G2352 и G2353 соответственно. Предварительный анализ геномов черноморских альговирусов свидетельствует как об их сходстве с наиболее изученными вирусами микроводорослей семейства Phycodnaviridae, так и об уникальности и индивидуальных особенностях их свойств, выявляя космополитную комбинацию генов черноморских альговирусов (Степанова и др., 2013).

Поиск, изоляция и изучение новых для науки альговирусов остается на острие интересов водной вирусологии, что связано как с экологической значимостью, широтой географического распространения и биоразнообразия их хозяев, так и с другими проблемами, в том числе и с возможной ролью альговирусов в патологии человека (Stepanova et al., 2011; Yolken et al., 2014). Выделение и изучение новых для науки альговирусов, в том числе к хозяевам, которые еще не были изолированы и описаны для экосистем определенных водоемов, является одновременно и изучением географического распространения хозяев вирусов – микроводорослей.

Цель работы – поиск, изоляция и предварительное изучение доступными способами свойств нового для науки альговируса микроводоросли *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert (Haptophyta), выделенной из планктона Японского моря, с учетом отсутствия сведений об изоляции этой микроводоросли из Черного моря.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С 2016 года впервые для поиска и изоляции черноморских альговирусов с помощью авторских запатентованных методов (Декл..., 2004; Пат..., 2012) была использована альгологически чистая культура *Tisochrysis lutea* (Haptophyta) клон MBRU\_Tiso-08 из коллекции «Морской биобанк» ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>). Морфология клеток микроводоросли – одиночные, подвижные, эллипсоидные клетки с размером около 5 микрон (рис. 1).



Рис. 1. Клетки культуры *Tisochrysis lutea* (<http://biancacosmetics.pl/ekstrakt-z-mikroalg-lipout-tm/>)

Паспортные данные используемой нами культуры микроводоросли, любезно предоставленной старшим научным сотрудником, к.б.н. Т. Ю. Орловой, сотрудницей «Национального научного центра морской биологии ДВО РАН (Владивосток), подробно описаны по адресу <http://marbank.dvo.ru/index.php/ru/kollektsiya/microalgae/rhynnesiophyceae/details/5/55>. Из этих данных следует, что культура коллекционной микроводоросли была создана на основе клеток данного вида, выделенных из планктона Японского моря в 2008 году.

Культура была адаптирована нами в течение 30 дней к стабилизирующей питательной среде Гольдберга (на основе черноморской воды) и использована для изоляции альговирусов в период 2016–2017 годов. Инокулят данного вида хранится и поддерживается в лаборатории отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ в питательной среде f/2 (Guillard, Ryther 1962), приготовленной на основе стерильной черноморской воды. Поддержание культуры в активном состоянии обеспечивается регулярными пересевами в

свежую питательную среду в процессе выращивания в накопительном режиме в колбах объемом 100 мл при температуре 16–18 °С и естественном освещении (на северном окне).

Для поиска и изоляции альговируса *T. lutea* были использованы пробы морской воды, отбор которых проводили с октября 2016 года по ноябрь 2017 года из стабильных точек из акватории Карантинной, Мартыновой и Артиллерийской бухт (рис. 2).

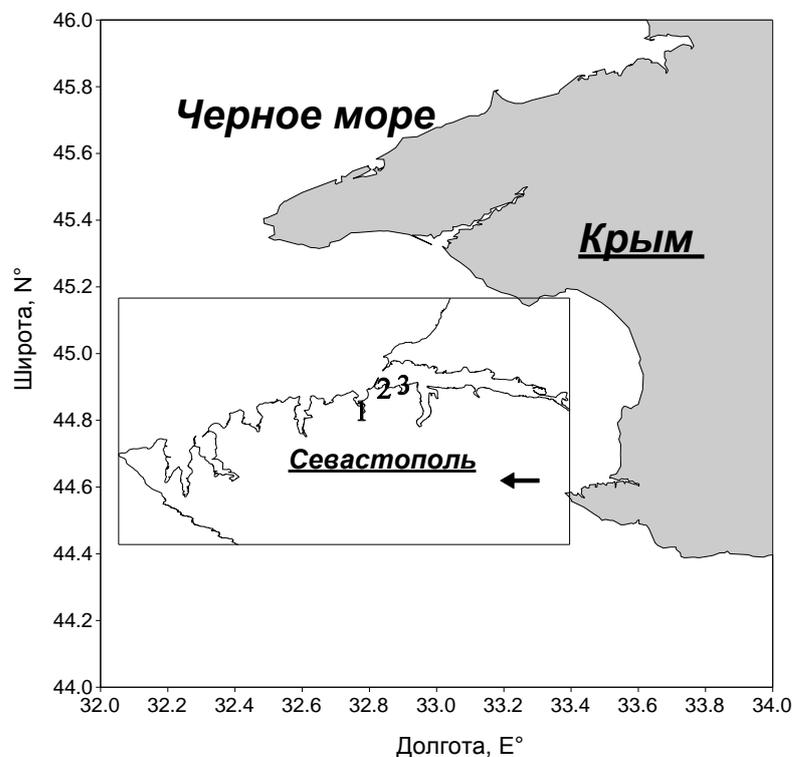


Рис. 2. Схема станций отбора проб морской воды в бухтах Севастополя: Карантинной (1), Мартыновой (2) и Артиллерийской (3)

Инкубационный (латентный) период для альговируса *T. lutea* определяли путем последовательных пассажей до установления стойкого (стабильного, постоянного) скрытого периода (до появления симптомов лизиса). Определение титра вируса в вирусной суспензии проводили на основе авторского метода (Декл..., 2004) путем десятикратного разведения в стабилизирующей среде Гольдберга с добавлением используемого в данной работе вида водорослей как индикатора.

Наличие суперкапсида у впервые изолированных альговирусов микроводоросли *T. lutea* (TIV) определяли путем обработки 2,0 мл вирусной суспензии в течение 1 часа 0,2 мл хлороформа, разрушающего липидную оболочку. Полученную суспензию далее проверяли на способность инфицировать и лизировать клетки *T. lutea*, для чего проводили несколько последовательных пассажей в эту индикаторную культуру.

Чувствительность вирусной суспензии TIV к низкой температуре изучали путем ее замораживания при –18 °С в морозильной камере на протяжении суток и более, после чего размороженную суспензию использовали для инфицирования культуры *T. lutea*.

Для предварительного определения максимального размера изолированного из Черного моря альговируса *T. lutea* (TIV) применяли метод ультрафильтрации с использованием установки – шприц, фильтродержатель и нитроцеллюлозные фильтры фирмы Sartorius. После фильтрации вирусных суспензий через фильтры с диаметром пор 0,3 и 0,2 мкм фильтраты использовали для заражения культуры индикаторной микроводоросли. Размер изучаемого нового альговируса TIV определяли в пределах диаметров пор фильтров с

учетом их максимального диаметра, когда фильтрат еще вызывал лизис культуры (максимальный размер вирусов).

Специфичность нового альговируса TIV изучали при его контакте с двумя видами микроводорослей – зеленой *Tetraselmis viridis* Rouchijajnen. R.E. Norris, Hori & Chihara и диатомовой *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Также изучали специфичность культуры *T. lutea* по отношению к вирусным штаммам микроводорослей *Tetraselmis viridis* (штамм TvV-S1) и *Phaeodactylum tricornutum* (штамм PtV-S18).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Поиск и изоляция альговируса *Tisochrysis lutea* из акватории бухт Севастополя.** Результаты проведенного поиска и изоляции альговируса *T. lutea* (TIV) из проб морской воды Карантинной, Мартыновой и Артиллерийской бухт с октября 2016 года по ноябрь 2017 года на фоне выполненного мониторинга альговирусов *T. viridis* (TvV) и *P. tricornutum* (PtV) приведены в таблице 1.

Изоляция нового для науки и экосистемы Черного моря альговируса *T. lutea* (TIV) пришлась на осенний (октябрь 2016 года), зимний (январь и февраль 2017 года) и летний (июнь, июль 2017 года) периоды. Надо отметить, что лето 2017 года до прихода в Крым антициклона «Люцифер» в августе, было прохладным, а осень 2016 года и зима в начале 2017 года были относительно теплыми, без морозов. По нашим первым наблюдениям предполагаем, что проявление сезонности альговируса *T. lutea* зависит от преобладания умеренной температуры среды (морская вода от +14 °С до +24 °С). Оптимальная температура воды, отмечаемая для роста и развития культуры *T. Lutea*, по паспортным данным – +20 °С. Вероятно, что на TIV и на его хозяина – микроводоросль *T. lutea* – влияют и другие абиотические факторы, однако эта проблема в условиях экосистемы Черного моря пока не изучена. Из пяти изолированных штаммов TIV два были выделены из проб воды, отобранных из относительно экологически благополучной открытой Карантинной бухты, а три – из неблагоприятной, закрытой Артиллерийской бухты.

Таблица 1

Результаты поиска альговирусов *Tetraselmis viridis* (TvV), *Phaeodactylum tricornutum* (PtV) и *Tisochrysis lutea* (TIV) из проб морской воды Карантинной, Мартыновой и Артиллерийской бухт с октября 2016 года по ноябрь 2017 года

Дата	№ пробы	Место отбора	TvV	PtV	TIV
1	2	3	4	5	6
20.10.16	1	Карантинная	-	-	TIV-S-16-1
	2	Мартынова	-	-	-
	3	Артиллерийская	-	-	-
19.01.17	4	Карантинная	-	-	-
	5	Мартынова	TvV-S-17-1	-	-
	6	Артиллерийская	-	-	TIV-S-17-1
21.02.17	7	Карантинная	-	PtV-S-17-1	TIV-S-17-2
	8	Мартынова	-	PtV-S-17-2	-
	9	Артиллерийская	-	PtV-S-17-3	-
21.03.17	10	Карантинная	TvV-S-17-2	PtV-S-17-4	-
	11	Мартынова	-	PtV-S-17-5	-
	12	Артиллерийская	-	-	-
20.04.17.	13	Карантинная	-	-	-
	14	Мартынова	-	-	-
	15	Артиллерийская	-	-	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
17.05.17	16	Карантинная	-	-	-
	17	Мартынова	-	-	-
	18	Артиллерийская	-	-	-
23.06.17	19	Карантинная	-	-	-
	20	Мартынова	-	-	-
	21	Артиллерийская	-	-	TIV-S-17-3
20.07.17	22	Карантинная	-	-	-
	23	Мартынова	-	-	-
	24	Артиллерийская	-	-	TIV-S-17-4
11.09.17	25	Карантинная	-	PtV-S-17-6	-
	26	Мартынова	-	PtV-S-17-7	-
	27	Артиллерийская	-	PtV-S-17-8	-
9.10.17	28	Карантинная	TvV-S-17-3	PtV-S-17-1	-
	29	Мартынова	-	PtV-S17-10	-
	30	Артиллерийская	-	PtV-S17-11	-
15.11.17	31	Карантинная	-	-	-
	32	Мартынова	-	PtV-S17-12	-
	33	Артиллерийская	-	PtV-S17-13	-
Итого	33 пробы морской воды		3 TvV	13 PtV	5 TIV

Примечание к таблице. « - » – проба отрицательна (альговирус не изолирован).

**Результаты изучения некоторых свойств нового для науки и экосистемы Черного моря альговируса микроводоросли *Tisochrysis lutea*.** При помощи доступных нам методов были выявлены следующие свойства нового для науки альговируса микроводоросли культуры *T. lutea*:

1. В результате пассирования был установлен стойкий инкубационный период – 24 ч.
2. Путем титрования вирусной суспензии инфекционный титр был определен в пределах  $10^4$  вирионов/мл.
3. На основе чувствительности к хлороформу у вируса было выявлено наличие суперкапсида, что свидетельствует о сложном строении вириона.
4. Определена чувствительность к замораживанию (при – 18 °С), что типично при сложном строении вирионов.
5. Путем фильтрации для данного альговируса был определен максимально возможный размер вирионов – не более 0,2 мкм.
6. На основе выполненных исследований, представленных в таблице 2, было установлено отсутствие контакта между новым альговирусом *T. lutea* с неиндикаторными для него микроводорослями *T. viridis* и *P. tricornutum*, что проявлялось ростом культур. Контакт этих микроводорослей с их специфическими вирусами проявляется в виде лизиса. При этом наблюдали отсутствие инфекционной активности со стороны альговирусов этих микроводорослей (штаммы TvV-S1 и PtV-S18) по отношению к микроводоросли *T. lutea* (рост культуры). Следовательно, контакт альговирусов со своими хозяевами – индикаторными микроводорослями сопровождался лизисом, что свидетельствует о специфичности изучаемых в этих опытах вирусов.

Таблица 2

Результаты контакта альговируса *Tisochrysis lutea* (штамм TIV-16-1) с микроводорослями *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum* (рост культур) и альговирусов этих микроводорослей (штаммы TvV-S1 и PtV-S18) при контакте с микроводорослью *Tisochrysis lutea* (рост культуры)

Культуры микроводорослей	Штаммы альговирусов		
	TIV-16-1	TvV-S1	PtV-S18
<i>Tisochrysis lutea</i>	лизис	рост	рост
<i>Tetraselmis viridis</i>	рост	лизис	рост
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	рост	рост	лизис

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для поиска и изоляции альговирусов была использована адаптированная к солености Черного моря культура *T. lutea*, выделенная из планктона Японского моря.

Впервые из проб морской воды бухт Севастополя были изолированы пять штаммов альговируса *T. lutea* – TIV-16-1, TIV-17-1, TIV-17-2, TIV-17-3, TIV-17-4. Полученные результаты поиска и изоляции пяти штаммов нового для науки альговируса косвенно свидетельствуют о возможном присутствии данного вида микроводорослей в экосистеме Черного моря.

Путем доступных методик были изучены некоторые свойства нового для науки и экосистемы Черного моря альговируса: установлен короткий инкубационный период (24 ч); титр вируса в суспензии не превышает  $10^4$  вирионов/мл; у TIV выявлено наличие суперкапсида; определена чувствительность альговируса к заморозке ( $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); установлено, что диаметр вирионов альговируса не превышает 200 нм; для альговируса микроводоросли *T. lutea* определена специфичность только по отношению к своему хозяину при изучении его контакта с двумя другими видами черноморских микроводорослей.

Работа выполнена в соответствии с планом в ИПТС по научной теме № 0012-2016-0008, в ИМБИ – в рамках госзадания по направлению «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом».

## Список литературы

Декларационный патент на изобретение 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів одноклітинних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta) / Степанова О.А. (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № 2003065499; заявл. 13.06.2003; опубл. 15.04.2004, Бюл. № 4 // Промислова власність. – 2004. – № 4.

Патент 97293 C2 UA, МПК C12N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів микроводорості *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) з проб морської води / Степанова О.А. (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № a201003881; заявл. 06.04.2010; опубл. 25.01.2012. Бюл. – 2012. – № 2.

Степанова О. А. Черноморские альговирусы // Биология моря. – 2016. – Т. 42, № 2. – С. 99–103.

Степанова О. А., Бойко А. Л., Щербатенко И. С. Компьютерный анализ геномов трех морских альговирусов // Микробиол. журн. – 2013. – Т. 75, № 5. – С. 76–81.

Guillard R. R. L., Ryther J. H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // Can. J. Microbiol. – 1962. – Vol. 8, N 2. – P. 229–239.

Stepanova O. A., Solovyova Y. A., Solovyov A. V. Results of Algae Viruses Search in Human Clinical Material // Ukrainica Bioorganica Acta. – 2011, N 2. – P. 53–56.

Suttle C. A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // Nature Reviews Microbiology. – 2007. – 5. – P. 801–812.

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).

Tyrrell, T. Merico, A. *Emiliana huxleyi*: bloom observations and the conditions that induce them / In: Thierstein, H. R., Youngs, J. R. (Eds.). – Coccolithophores – From Molecular Processes to Global Impact. – Springer, 2004. – P. 75–97.

Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. and Molec. Biol. Reviews. – 2000. – Vol. 64, N 1. – P. 69–114.

Yolken R. H., Lorraine Jones-Brando, David D. Dunigan et al. Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice // PNAS. 2014. – Vol. 111, N 45. (November 11). – P. 16106–16111.

**Stepanova O. A. Stelmakh L.V. Search and isolation of the new algal virus of algae *Tisochrysis lutea* from the ecosystem of the Black Sea in the bays of Sevastopol (the Crimean region) // Ekosystemy. 2017. Iss. 12 (42). P. 28–34.**

For the first time from the bays of Sevastopol in 2016–2017, have been isolated and partially studied five strains of the new algal virus of algae *Tisochrysis lutea* Bendif et Probert (Haptophyta). Isolation of the algal virus of algae *Tisochrysis lutea* from the ecosystem of the Black Sea indicates the circulation of this algae in the studied water areas.

*Key words:* algal virus of microalgae *Tisochrysis lutea*, ecosystem of the Black Sea.

*Поступила в редакцию 29.09.17*