

УДК 578.4(262.5)

**МОНИТОРИНГ АЛЬГОВИРУСОВ ИНДИКАТОРНЫХ К ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ
СИТУАЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *TETRASELMIS VIRIDIS* И
PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM В БУХТАХ СЕВАСТОПОЛЯ
(2002–2018 ГГ.)**

Степанова О. А.

Институт природно-технических систем, Севастополь, Республика Крым, Россия
E-mail: solar-ua@ya.ru

Выполнен анализ частоты изоляции альговирусов индикаторных к экологическому благополучию микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum* из трех бухт Севастополя за период 2002–2018 гг. Полученные результаты свидетельствуют, что частота изоляции альговируса устойчивой к экологическим факторам микроводоросли *Tetraselmis viridis* наблюдалась в пределах от 54–52 % (2002–2003 и 2015 гг.) до 3–0 % (2007–2009 гг.). Для альговируса требовательной к условиям среды микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* частота изоляции колебалась от 53–45 % (2008, 2018 гг.) до 0 % (2015 г.).

На основании полученных данных с учетом требовательности к условиям среды обитания или устойчивости к неблагоприятным экологическим факторам хозяев альговирусов логично предположить экологическое благополучие в изучаемых акваториях в 2008 г. (максимум частоты изоляции альговируса *Phaeodactylum tricornutum*) и неблагополучие в 2015 г. (минимум частоты изоляции альговируса *Phaeodactylum tricornutum*).

Ключевые слова: альговирусы, индикаторы экологического благополучия – микроводоросли *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum*, бухты Севастополя, экологическое благополучие акватории Севастополя.

ВВЕДЕНИЕ

Морские вирусы среди гидробионтов наименее изучены, однако, по мнению ученых, они являются главными игроками в глобальной экологии [1]. Среди морских вирусов наибольший интерес у ученых вызывают альговирусы – вирусы микроводорослей, роль которых в экологии нашей Планеты сложно переоценить. Мониторинг черноморских альговирусов в бухтах Севастополя, в т.ч. альговирусов микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornutum*, часто используемых в качестве индикаторов для оценки экологической ситуации в акваториях [2–5], проводится с мая 2002 г.

До 2014 г. поиск черноморских альговирусов выполнялся на базе Института биологии южных морей – ИнБЮМ (ныне Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского – ИМБИ). С 2015 г. работы были продолжены в Институте природно-технических систем (г. Севастополь). За период с мая 2002 г. по май 2018 г. из разных проб (морской воды и гидробионтов) с помощью

запатентованных авторских методик [6, 7] было изолировано около 300 штаммов новых для науки альговирuсов морских микроводорослей *T.viridis*, *Dunaliella viridis*, *P.tricornutum*, *Prorocentrum pusillum*, *Isochrysis galbana*, *Tisochrysis lutea*. Также были выделены новые для экосистемы Черного моря штаммы альговирuса микроводоросли *Emiliana huxleyi* и цианофага к культуре цианобактерии *Synechococcus*. Основные сведения об изоляции черноморских альговирuсов и их свойствах отражены в [8–10].

Первые результаты по анализу частоты изоляции альговирuсов микроводорослей *T.viridis* (TvV) и *P.tricornutum* (PtV) из разных по экологическому благополучию бухт Севастополя были представлены в [11]. Полученные данные свидетельствовали о преобладании в закрытой и экологически неблагополучной Артиллерийской бухте, входящей в состав Севастопольской бухты, альговирuсов устойчивой к неблагоприятным экологическим факторам микроводоросли *T.viridis*. И, наоборот, в открытой Песочной бухте преобладали вирусы требовательной к условиям среды микроводоросли *P.tricornutum*. Таким образом, по нашему мнению, логично утверждать, что изоляция альговирuсов из акваторий позволяет получить информацию не только об экологии (сезонность, географическое распространение, динамика распределения) хозяев (микроводорослей), но и об экологическом благополучии изучаемых бухт, в случае поиска вирусов, хозяева которых являются индикаторными по отношению к экологической ситуации.

С целью оценки изменения экологического благополучия изучаемых акваторий на протяжении 2002–2018 гг. выполнен анализ частоты изоляции альговирuсов устойчивой к факторам среды микроводоросли *T.viridis* и требовательной *P.tricornutum* в трех бухтах Севастополя.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск и изоляцию альговирuсов проводили из проб морской воды, которые в 2002–2018 гг. с разной степенью регулярности отбирали из трех бухт Севастополя, отличающихся по экологическому благополучию – открытой Карантинной, закрытой Мартыновой, где размещена мидийная ферма, и экологически неблагополучной, подвергающейся антропогенной нагрузке Артиллерийской (рис. 1).

Отбор проб морской воды не проводили в 2004, 2013 и 2014 гг., т.к. в эти годы выполнялись поиск, изоляция и изучение других новых для науки или экосистемы Черного моря альговирuсов [8, 9].

Исследования проводили в разных по экологическому статусу бухтах – открытой, закрытой с мидийной фермой и закрытой, подвергающейся антропогенному загрязнению, – для получения усредненных данных ситуации относительно акватории побережья Севастополя, логично предполагая, что выявленные данные можно будет экстраполировать и на побережья Крыма, интерпретируя их в качестве обобщенных фоновых наблюдений.

Поиск и изоляцию альговирuсов выполняли с использованием простых, легко воспроизводимых, разработанных и запатентованных авторских способов [6, 7], методика которых описана в наших опубликованных работах [8, 9, 11].

Для изоляции альговирусов использовали жидкие культуры микроводорослей *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen, R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980) и *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897). Культуры были получены из коллекции микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ (ныне ИМБИ) и поддерживались в стабилизирующей питательной среде Гольдберга.

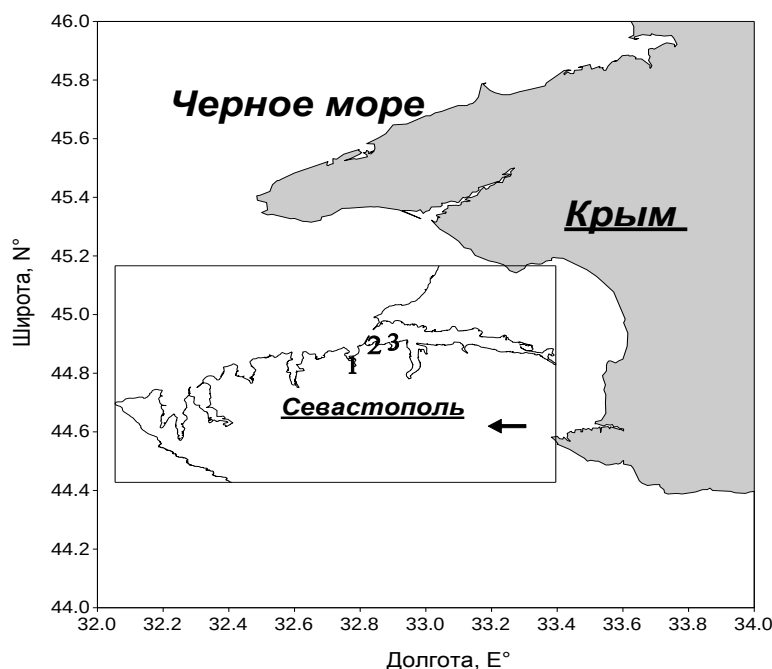


Рис. 1. Схема станций отбора проб морской воды в бухтах Севастополя: Карантинной (1), Мартыновой (2) и Артиллерийской (3).

Поскольку для каждого нового изолята альговирусов микроводорослей *T.viridis* (TvV) и *P.tricornutum* (PtV) фиксируются иные пространственно-временные параметры их поиска и выделения, то и каждый вирусный изолят обозначен как вирусный штамм или вирусный вариант.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частота изоляции альговирусов двух видов микроводорослей – *T. viridis* (TvV) и *P.tricornutum* (PtV) из трех отличающихся по экологическому благополучию бухт Севастополя за период 2002–2018 гг., выражаемая в процентах по отношению к числу изученных проб морской воды, представлена в таблице 1, а также в виде графиков и диаграмм на Рис. 2.

Как можно видеть из данных, отраженных в таблице 1, всего из 269 проб морской воды было изолировано 109 альговирусов, из которых 48 штаммов альговируса микроводоросли *T.viridis* и 61 штамм альговируса микроводоросли

P. tricornutum. Таким образом, в среднем за весь изучаемый период частота изоляции для TvV составляла 18 %, а для PtV – 23 %. Полученные усредненные показатели имеют незначительные различия и свидетельствуют о необходимости регулярного мониторинга альговирусов, хозяевами которых являются индикаторные в отношении экологической ситуации микроводоросли.

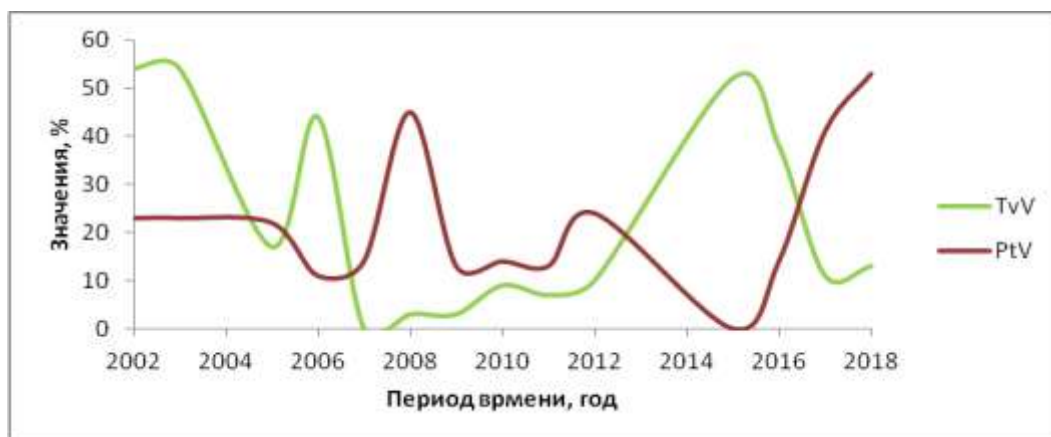
Таблица 1

Сравнительные результаты изоляции альговирусов *Tetraselmis viridis* (TvV) и *Phaeodactylum tricornutum* (PtV) из проб морской воды трех бухт Севастополя (Карантинная, Маргынова, Артиллерийская) в период с мая 2002 по май 2018 гг.

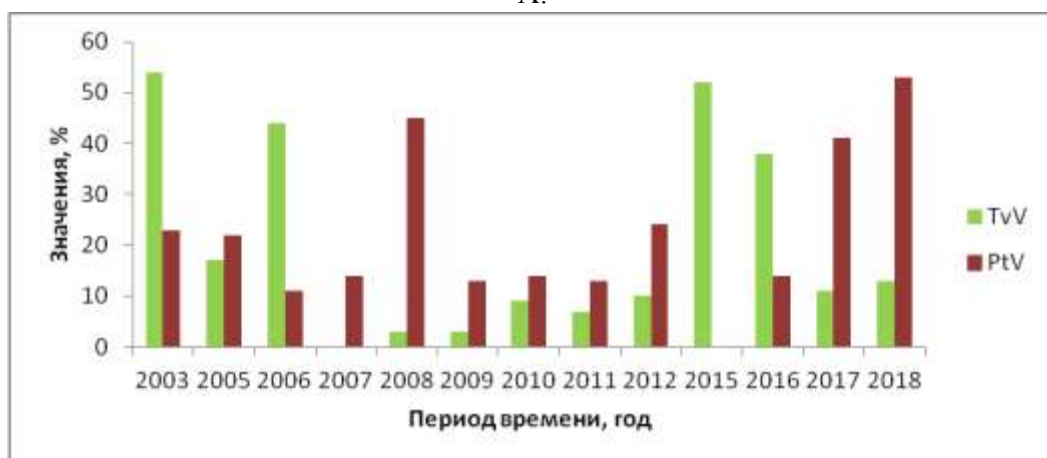
Количество проб и вирусов, % изоляции	Временные периоды (годы)						
	2002–2003	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Количество проб воды	13	23	9	14	31	30	22
Число изолятов TvV/ PtV	7/3	4/5	4/1	-/2	1/14	1/4	2/3
% изоляции из проб TvV/ PtV	54 % / 23 %	17 % / 22 %	44 % / 11 %	0 % / 14 %	3 % / 45 %	3 % / 13 %	9 % / 14 %
Количество проб и вирусов, % изоляции	Временные периоды (годы)						Итого
	2011	2012	2015	2016	2017	2018 (I-V)	
Количество проб воды	15	21	25	21	30	15	269
Число изолятов TvV/ PtV	1/2	2/5	13/-	8/3	3/11	2/8	48 / 61
% изоляции из проб TvV/ PtV	7 % / 13 %	10 % / 24 %	52 % / 0 %	38 % / 14 %	11 % / 41 %	13 % / 53 %	18 % / 23 %

Примечание: знак « - » обозначает отсутствие изолятов (штаммов) альговирусов при изучении проб морской воды.

Частота изоляции альговирусов микроводорослей *T.viridis* и *P.tricornutum* в разные периоды на протяжении 2002–2018 гг. значительно менялась, наблюдаясь в пределах от 54–52 % (2002–2003 и 2015 гг.) до 3–0 % (2007–2009 гг.) у TvV, и от 53–45 % (2008, 2018 гг.) до 0 % (2015 г.) у PtV.



А.



Б.

Рис. 2. Изменения частоты изоляции альговирuses микроводорослей *Tetraselmis viridis* (TvV) и *Phaeodactylum tricornutum* (PtV) из проб морской воды трех бухт Севастополя (Карантинная, Мартынова, Артиллерийская) в период с мая 2002 по май 2018 гг. в виде графиков (А.) и диаграмм (Б.).

По нашему мнению, логично утверждать, что зафиксированные изменения в частоте изоляции альговирuses являются отражением изменений в ситуации с их хозяевами – микроводорослями *T.viridis* и *P.tricornutum*, чутко реагирующими на условия среды обитания (Дятлов, Петросян, 2001; Кузьминова, 2004; Маркина, Айздайчер, 2006; Round, 1965). Таким образом, изменения в частоте изоляции альговирuses *T.viridis* и *P.tricornutum* сигнализируют об изменениях экологической ситуации в изучаемых бухтах. Иными словами снижение частоты изоляции альговируса требовательной к условиям среды обитания микроводоросли *P.tricornutum* свидетельствует об ухудшении экологической ситуации, а повышение – об улучшении экологического статуса в изучаемой акватории.

На графиках (А.) и диаграммах (Б.), представленных на Рис. 1, можно видеть значительные различия в частоте изоляции альговирuсов. Так на графических линиях можно наблюдать различия в виде «ножниц» в 2002–2003, 2006, 2008, 2015 и 2018 гг., когда повышение частоты изоляции PtV относительно TvV (в 2008 и 2018 гг.) свидетельствует об экологическом благополучии, а повышение частоты изоляции TvV относительно PtV (в 2002–2003, 2006 и 2015 гг.) сигнализирует об ухудшении экологического статуса изучаемых акваторий.

Наиболее значительное отличие в частоте изоляции альговирuса микроводоросли *P.tricornutum* относительно альговирuса микроводоросли *T.viridis* можно наблюдать в 2008 и 2018 гг., когда разница составляет 42 % и 40 % соответственно.

Однако наибольшее различие между частотами изоляции этих вирuсов наблюдалось в 2015 г., когда разница составляла 52 % при 0 % изоляции для PtV. Поскольку поиск альговирuсов в 2018 г. еще будет продолжен, то особое внимание следует обратить на 2008 и 2015 гг., когда наблюдается наиболее высокая разница в частоте изоляции альговирuсов двух индикаторных в отношении экологической ситуации микроводорослей.

Таким образом, на основании полученных данных с учетом требовательности к условиям среды обитания и устойчивости к неблагоприятным экологическим факторам хозяев альговирuсов – микроводорослей – логично предположить экологическое благополучие в изучаемых акваториях у побережья Севастополя в 2008 г. и неблагополучие в 2015 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный поиск черноморских альговирuсов индикаторных к экологическому благополучию микроводорослей *T. viridis* и *P. tricornutum* из трех бухт Севастополя в период 2002–2018 гг. и выполненный анализ полученных результатов позволили установить следующее:

1. Среднее значение частоты изоляции альговирuсов микроводорослей *T. viridis* и *P. tricornutum* за период 2002–2018 гг. составляет 18 % и 23 % соответственно, что свидетельствует о незначительной разнице в усредненных показателях их частоты изоляции.
2. Частота изоляции у альговирuса микроводоросли *T.viridis* наблюдалась в пределах от 54–52 % (2002–2003 и 2015 гг.) до 3–0 % (2007–2009 гг.) и у альговирuса микроводоросли *P.tricornutum* – от 53–45 % (2008, 2018 гг.) до 0 % (2015 г.).
3. Наиболее высокая разница в частоте изоляции альговирuсов микроводорослей *T.viridis* и *P.tricornutum* была выявлена в 2008 г. (частота изоляции 45 % для PtV и 3 % для TvV) и в 2015 г. (частота изоляции 0 % для PtV и 52 % для TvV).
4. Полученные при анализе данные с учетом требовательности к условиям среды обитания и устойчивости к неблагоприятным экологическим факторам хозяев альговирuсов свидетельствуют об экологическом благополучии в изучаемых акваториях в 2008 г. и неблагополучии в 2015 г.

Список литературы

1. Suttle C. A. Marine viruses – major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology*. – 2007. – No 5. – P. 801–812.
2. Дятлов С. У. *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. (Chrysophyta) как тест-объект. Общие положения / Дятлов С. У., Петросян А. Г. // Альгология. – 2001. – 11, №1. – С.145–154.
3. Кузьмина Н. С. Действие хозяйственно-бытовых сточных вод на некоторых представителей морских микроводорослей отдела *Chlorophyta* / Кузьмина Н. С. // Материалы междунар. научно-практич. конф. молодых ученых. (Киев, 25–28 февраля 2002 г.). – Киев, 2002. – С.157–158.
4. Маркина Ж. В. Содержание фотосинтетических пигментов, рост и размер клеток микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* при загрязнении среды медью / Маркина Ж. В., Айзайчер Н. А. // Физиология растений. – 2006. – Т.53, №3. – С. 343–347.
5. Round F. E. The biology of Algae. / Round F. E. – London: Edward Arnold., 1965. – 269 p.
6. Декл. Пат. на изобретение 65864А 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. N 4.
7. Пат. 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.
8. Степанова О. А. Мониторинг альговірусів Чорного моря (2002–2015 гг.) / Степанова О. А. // Системи контролю оточуючої середовища. – 2015. – Вып. 1 (21). – С. 103–107.
9. Степанова О. А. Черноморские альговіруси / Степанова О. А. // Биология моря. – 2016. – Т. 42, № 2. – С. 99–103.
10. Степанова О. А. Поиск и изоляция нового альговіруса микроводоросли *Tisochrysis lutea* из экосистемы Чорного моря в бухтах Севастополя (Крымский регион) / Степанова О. А., Стельмах Л. В. // Экологические системы. – 2017. – Вып.12 (42). – С.28–34.
11. Степанова О. А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Чорного моря. / Степанова О. А. – Севастополь: Мир "ЭКСПРЕСС ПЕЧАТЬ", 2004. – 308 с.

MONITORING OF ALGAL VIRUSES OF INDICATORS TO ENVIRONMENTAL SITUATION MICROALGAE *TETRASELMIS VIRIDIS* AND *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* IN SEVASTOPOL BAYS (2002–2018)

Stepanova O. A.

Institute of Natural and Technical Systems, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: solar-ua@ya.ru

The frequency of isolation of algal viruses of microalgae *Tetraselmis viridis* and *Phaeodactylum tricornutum*, as indicators to ecological well-being, from the bays of Sevastopol for the period of 2002–2018 is analyzed.

The average value of the isolation frequency of algal viruses of microalgae *Tetraselmis viridis* and *Phaeodactylum tricornutum* for the all observed period is 18 % and 23 % respectively, which indicates a slight difference in the average of their insulation frequency.

The obtained results indicate that the frequency of isolation of algal viruses of microalgae *Tetraselmis viridis*, which is resistant to environmental factors, was observed

in the range from 54–52 % (in 2002–2003 and 2015) to 3–0 % (in 2007–2009). The frequency of isolation of algal viruses of microalgae *Phaeodactylum tricornutum*, which is demanding of good environment conditions, was observed in the range from 53–45 % (2008, 2018) to 0 % (2015).

So the highest difference in the isolation frequency of algal viruses of microalgae *Tetraselmis viridis* and *Phaeodactylum tricornutum* was detected in 2008 (insulation frequency 45 % for *Phaeodactylum tricornutum* Virus and 3 % for *Tetraselmis viridis* Virus) and in 2015 (insulation frequency 0 % for *Phaeodactylum tricornutum* Virus and 52 % for *Tetraselmis viridis* Virus).

On the basis of the data obtained, taking into account the demanding of exacting environmental conditions or resistance to unfavorable environmental factors of viral hosts, it is logical to assume ecological well-being in the studied water areas in 2008 (maximum isolation frequency of algal viruses of *Phaeodactylum tricornutum*) and unfortunate in 2015 (minimum isolation frequency of algal viruses of *Phaeodactylum tricornutum*).

Keywords: algal viruses, indicators of ecological well-being - microalgae *Tetraselmis viridis* and *Phaeodactylum tricornutum*, ecological well-being of the bays of Sevastopol.

References

1. Suttle C. A. Marine viruses - major players in the global ecosystem, *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 801 (2007).
2. Dyatlov S. U., Petrosyan A. G. *Phaeodactylum tricornutum* Bohl. (Chrysophyta) as a test object. General provisions. *Algology*, (**11**) **1**, 145 (2001).
3. Kuzminova N. S. The effect of household wastewater on some representatives of marine micronutrients of the *Chlorophyta* department. *Materials of the International. scientific and practical. Conf. of young scientists*, (Kiev, February 25–28, 2002) 157 (2002).
4. Markina Zh. V., Aizdaycher N. A. Consistency of photosynthetic pigments, growth and size of cells of microalgae *Phaeodactylum tricornutum* with contamination of the medium with copper, *Physiology of plants*, (**53**) **3**, 343 (2006).
5. Round F. E. The biology of Algae. *London: Edward Arnold*, 269 p. (1965).
6. Decl. Pat. of invention 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12. Method of isolation of algal viruses of unicellular algae, for example *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta) / Stepanova O. A. (UA); claimant O. O. Kovalevsky Institute of biology of southern seas of National Academy of Sciences of Ukraine (UA). No. 2003065499; claimed. 06.13.2003; publ. 15.04.2004, Bul. № 4 // Promyslova vlasnist. 2004. N 4.
7. Pat. 97293 C2 UA, IPC C12N 1/12. Method of isolation of algal viruses of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) from samples of marine water / Stepanova O. A. (UA); claimant O. O. Kovalevsky Institute of biology of southern seas of National Academy of Sciences of Ukraine (UA). No. a201003881; claimed. 06/04/2010; publ. 25.01.2012. Bul. 2012 No. 2.
8. Stepanova O. A. Monitoring of Algal viruses of the Black Sea (2002–2015), *Systems of control of environment*, (**21**) **1**, 103 (2015).
9. Stepanova O. A. Black Sea algal viruses, *Biology of the sea*, (**42**) **2**, 99 (2016).
10. Stepanova O. A., Stelmakh L. V. Search and isolation of the new algal virus of microalgae *Tisochrysis lutea* from the ecosystem of the Black Sea in the bays of Sevastopol (Crimean region), *Ecosystems*, (**42**) **12**, 28 (2017).
11. Stepanova O. A. Ecology of allochthonous and autochthonous viruses of the Black Sea, 308 (*Sevastopol: Word "EXPRESS PRESS"*, 2004).