

О.А.Степанова, И.И.Казанкова

Институт биологии южных морей, г.Севастополь

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ
УТИЛИЗАЦИИ МИДИЕЙ *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*
ЧЕРНОМОРСКИХ АЛЬГОВИРУСОВ**

Экспериментальным путем была установлена утилизация (возможное усвоение и концентрация в органах) альговирuses из воды черноморской мидией *Mytilus galloprovincialis* до 99 %, причем эта величина зависела от продолжительности опыта и от сложности морфологии вируса. Выявлено, что часть альговирuses, концентрируемая в организме фильтрующих моллюсков, возвращается в окружающую среду с фекалиями, транспортируясь на дно, где может быть использована бентофагами или диффундировать обратно в пелагиаль. Полученные результаты свидетельствуют, что мидии не только утилизируют вирусную составляющую, но и выполняют определенную роль в циркуляции вируссов, переводя их из пелагиали в бентосный биотоп.

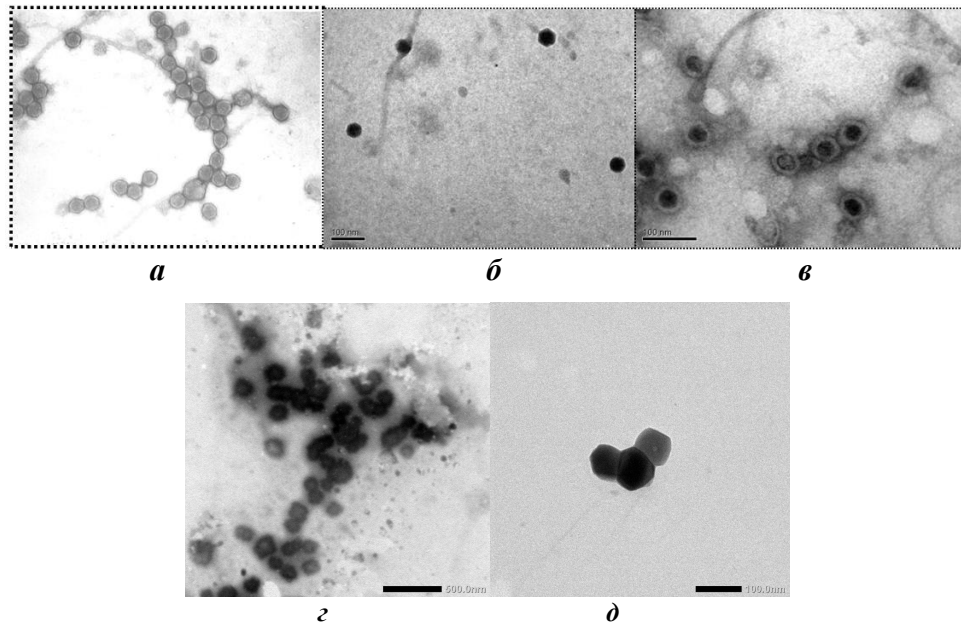
Ключевые слова: *черноморские альговирuses, мидия Mytilus galloprovincialis, циркуляции альговирuses.*

Вирусы гидросферы играют важную, но мало изученную роль в экологии водоемов, являясь самой многочисленной группой среди обитателей планктона и бентоса. Вирусный лизис является основной причиной ежедневной гибели около 20 % гетеротрофных бактерий и 3 – 5 % клеток фитопланктона, при этом в среде появляются микронные и субмикронные органические частицы, которые поглощаются различными гидробионтами (представителями микропланктона, личинками зоопланктона и др.), что может способствовать их росту и развитию [1]. Созданная модель бактериальной продукции внутри микросообщества, содержащего вирусы, выявила, что при высоком уровне активности бактериофагов, продукция мезозоопланктона в основном повышается на 5 – 15 %, что свидетельствует о значительном влиянии вируссов на биологическую продукцию морей [2]. К подобному заключению пришли авторы и математической модели, анализирующей морскую вирусную инфекцию микроорганизмов [3]. Описано влияние вируссов на микробную и водорослевую динамику в бентосе, свидетельствующее о положительной роли вирусного лизиса в трофике бентосных микроводорослей [4].

Известно, что фильтрующие моллюски способны на 100 кратную концентрацию вируссов из водной среды [5, 6]. Это их свойство применяют в создании биофильтров для очистки прибрежных акваторий от аллохтонных микроорганизмов, в т.ч. патогенных для человека вируссов и бактерий [7]. Моллюски были предложены и для использования в мониторинге контаминации природных водоемов патогенными вируссами [8]. О концентрации моллюсками патогенных вируссов из воды с последующим освобождением от них есть множество работ, анализ которых представлен в [9].

Исследований роли моллюсков в циркуляции природных морских вирусов, включая их концентрацию в организме, возможное усвоение в качестве органической составляющей микропланктона, и выведение с фекалиями с дальнейшим оседанием на дно, пока описано не было. В связи с этим целью нашей работы было изучение утилизации мидией *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 черноморских альговирусов, концентрации их в мантийной (межстворчатой) жидкости и выведении с фекалиями. Под утилизацией в наших исследованиях понималось поглощение мидиями из воды альговирусов, которые могли быть усвоены, а также сконцентрированы в органах моллюсков.

Материалы и методы. Исследования проводили с использованием модели вода-альговирусы-мидии-фекалии (опыт) и вода-мидии-фекалии (контроль) с учетом всех контролей воды, вирусных суспензий, мидий и фекалий. Всего было проведено 15 экспериментов, продолжительность которых последовательно удлиняли от 1,5 ч до 12 дней. В качестве альговирусов были использованы суспензии вирусов микроводорослей *Tetraselmis viridis* (TvV), *Dunaliella viridis* (DvV), *Prorocentrum pusilla* (PpV) и *Isochrysis galbana* (IgV). Вирусы были изолированы при помощи запатентованной авторской методики [10] с использованием жидких культур микроводорослей, полученных из отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ. Морфология и особенности черноморских альговирусов, в т.ч. геномный состав некоторых штаммов описаны ранее [9, 11 – 16]. Электронномикроскопические фотографии черноморских альговирусов пяти видов микроводорослей представлены (рис.1).



Р и с . 1 . Электронномикроскопическое изображение вирионов TvV (a) – TvV-S20, PtV (б) – PtV-SI18, DvV (в) – DvV-SI2, PpV (г) – PpV – S15, IgV (д) – IgV-S1. Вирионы имеют форму икосаэдров размером 56 – 60, 45 – 48, 50 – 53, 128 – 132 и 88 – 92 нм для вирусов TvV, PtV, DvV, PpV и IgV соответственно.

В моделях опыта и контроля использовали равные объемы предварительно пастеризованной морской воды (от 0,1 до 1 л). В опыт добавляли суспензию альговируса с разным первоначальным инфекционным титром. В контроль дополнительно добавляли объем воды, равный объему вирусной суспензии в опыте. Затем из опыта и контроля отбирали по 10 мл воды (для определения первоначального титра вируса и определения в конце эксперимента его возможного изменения при хранении) и помещали туда одинаковое количество мидий (от 4 до 17 экз.) с длиной раковины от 25 до 65 мм.

За сутки до эксперимента мидий, очищенных от обрастателей и трижды промытых в проточной водопроводной воде, помещали в пастеризованную морскую воду для освобождения от возможно присутствующих в них альговирусов. Отбор мантийной жидкости (до и после эксперимента) проводили путем осторожного раздвигания створок раковин стерильным скальпелем. При определении общего объема мантийной жидкости исходили из размерного состава и количества моллюсков, участвующих в эксперименте, учитывая, что максимальная доля мантийной жидкости от общего веса мидий может достигать до 20 – 40 % [17, 18].

Фекалии собирали на мельничное сито с диаметром отверстия в 100 мкм, подсушивали фильтровальной бумагой и взвешивали на аналитических весах. После этого к фекалиям добавляли пастеризованную морскую воду для получения 10 % взвеси, используемой для определения титра альговирусов. В проведенных экспериментах мидии не образовывали псевдофекалий.

Определение инфекционного титра вирусов в пробах из экспериментов проводили путем десятикратного разведения на основе авторской методики [10]. Метод позволяет определять титр вирусов в инфекционных единицах в 1 мл исследуемого материала. Для облегчения представления о концентрации вирусов в пробах мы предположили, что 1 инфекционная единица будет соответствовать инфекционному действию как минимум 1 вируса. Таким образом, для удобства восприятия результатов мы искусственно уравнивали инфекционные единицы с числом вирусов.

Результаты и их обсуждение. Первоначальный титр альговирусов в воде опыта в семи экспериментах был в пределах 10^{2-5} , в трех – 10^6 и в пяти – 10^{7-9} в 1 мл. Нашими предварительными исследованиями было определено, что численность вирусов в черноморском микропланктоне не превышала сотни тысяч в 1 мл [9, 12]. Необходимо отметить, что в проведенных экспериментах концентрация вирусов, близкая природной, являлась наиболее оптимальной и результативной для выполнения необходимых подсчетов. Так, в некоторых опытах при первоначальной численности вирусов 10^{6-9} в 1 мл воды не всегда наблюдали изменения титра вирусов в воде в конце эксперимента. По нашему мнению, это может быть связано в основном с методической особенностью определения вирусного титра в наших исследованиях - использования десятикратного разведения, что дает возможность учитывать изменения, происходящие не менее чем в 10 раз. Вероятно, что использование двукратного разведения (в 2, 4, 16 и т.д. раз) для определения титра вируса в изучаемых пробах может позволить наблюдать изменения и при более высоких показателях первоначального титра вирусов в проводимых экспериментах.

Было определено, что через 1,5 – 20 ч концентрация вирусов в мантийной жидкости мидий соответствовала первоначальной вирусной концентрации в окружающей среде, т.е. в воде (10^{2-9} вирусов в 1 мл), которая практически не менялась в течение 1,5 – 20 ч. Через несколько суток концентрация вирусов в воде обычно снижалась на 1 – 2 порядка, что при пересчете составляло 0,01 – 20 % от первоначального общего числа вирусов. В мантийной жидкости титр вирусов был выше на 1 – 2 порядка относительно воды в опыте в конце эксперимента, что при пересчете составляло 0,01 – 15 % от первоначального общего числа вирусов в системе. Таким образом, при более длительных экспериментах (более 2 – 3 суток) наблюдали снижение титра вирусов на 1 – 2 порядка в воде и нарастание на 1 – 2 порядка в мантийной жидкости.

Концентрация вирусов в фекалиях доходила до 10^6 в 1 мл 10 % взвеси, что при пересчете на общее количество веса фекалий соответствовало не более 40000 вирусов. Количество вирусов, связанных с фекалиями, несмотря на их высокую концентрацию в изучаемой взвеси, составляло не более 2,2 % от первоначального числа вирусов в опыте.

Во всех пробах воды, мантийной жидкости мидий и фекалий из контроля, отобранных в конце эксперимента, а также в пробах мантийной жидкости мидий до эксперимента альговирусы обнаружены не были. В пробах, содержащих воду с первоначальной концентрацией вируса и хранившихся до конца эксперимента, титр вируса не менялся.

Количество альговирусов, утилизированных мидиями, (Y) определяли по формуле:

$$Y = K_{вн} \cdot O_v - (K_{вк} \cdot O_v + K_m \cdot O_m + K_f \cdot B_f),$$

где $K_{вн}$ обозначает концентрацию вируса в 1 мл воды в начале опыта, $K_{вк}$ – концентрацию вируса в 1 мл воды в конце опыта, K_m – концентрацию вируса в мантийной жидкости в 1 мл, K_f – концентрацию вируса в 1 г фекалий, O_v – объем воды в мл, O_m – общий объем мантийной жидкости в мл, B_f – вес фекалий в г.

Представленная формула в процентном выражении выглядит следующим образом:

$$100 \% - [(от\ 0,01\ до\ 20\ \%) + (от\ 0,01\ до\ 15\ \%) + (0,01\ до\ 2,2\ \%)] = от\ 70\ до\ 99\ \%.$$

Утилизация альговирусов мидиями зависела не только от продолжительности опыта, как было отмечено выше, но и от вида вируса. Так, минимальную утилизацию (70 %) наблюдали при использовании в эксперименте вируса микроводоросли *I. galbana* (IgV), который в отличие от других вирусов (TvV, DvV и PpV) обладает суперкапсидом.

Вопрос о том, какая доля поглощенных из воды альговирусов была усвоена в качестве органической материи, а какая была сконцентрирована в отдельных органах мидий, остается не изученным, чему и будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Заключение и выводы. Полученные в модельных экспериментах результаты выявили утилизацию альговирусов черноморскими мидиями *M. galloprovincialis* из окружающей среды до 99 %, причем эта величина зависела от продолжительности опыта и от сложности морфологии вируса.

Было установлено, что часть альговирусов, концентрируемая в организме фильтрующих моллюсков, возвращается в окружающую среду с фекалиями и транспортируется на дно, где может быть использована бентофагами или диффундировать обратно в пелагиаль.

Таким образом, путем эксперимента было определено, что мидии не только утилизируют вирусную составляющую, но и выполняют определенную роль в циркуляции вирусов, переводя их из пелагиали в бентосный биотоп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. and Molec. Biol. Reviews.– 2000.– 64, № 1.– P.69-114.
2. Murray A.G., Eldridge P.M. Marine viral ecology. Incomparation of bacteriophage into the microbial planktonic food web paradigm // J. Plankton. Res.– 1994.– 16, № 6.– P.627-641.
3. Beretta E., Kuang Y. Modeling and analysis of marine bacteriophage infection // Math. Biosci. – 1998.– 149, № 1.– P.57-76.
4. Hewson I., O'Neil J.M., Heil C.A. et al. Effects of concentrated viral communities on photosynthesis and community composition of cooccurring benthic microalgae and phytoplankton // Aquat. Microb. Ecol.– 2001.– 25, № 1.– P.1-10.
5. Enriques R., Fronsher G.G., Hochstein-Mintzel V. et al. Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels // J. Med. Virol.– 1992.– 37, № 3.– P.174-179.
6. Franco E., Toti L., Gabrieli R. et al. Depuration of *Mytilus galloprovincialis* experimentally contaminated with hepatitis A virus // Int. J.Food Microbiol.– 1990.– 11, № 3-4.– P.321-328.
7. Говорин И.А., Адобовский В.Н., Катков В.Н. Санитарно-бактериологические аспекты использования марикультуры для биомелиорации морской среды // Гидробиол. журнал.– 1994.– т.30, № 1.– С.44-53.
8. Marino G. Una idea per una piu rapida metodica di isolamento di virus enteric dalle aequae di mare al fine della loro valutazione igienica // J. San. Publ.– 1992.– 48, № 6.– P.393-396.
9. Степанова О.А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря.– Севастополь: Мир "ЭКСПРЕСС ПЕЧАТЬ", 2004.– 308 с.
10. Степанова О.А. Спосіб ізоляції альговірусів одноклітинних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta). Деклараційний патент на винахід 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12.– N2003065499. Заявлено 13.06.03; Опубл. 15.04.04, Бюл.№4 // Промислова власність.– 2004.– № 4.– С.1-4.
11. Степанова О.А. Альговирусы из бухт Севастополя // Ботанические исследования в азиатской России: Материалы XI съезда Русского ботанического общества (18-22 августа 2003 г., Новосибирск-Барнаул). Т.1.– Барнаул: АзБука, 2003.– С.143-144.
12. 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.
13. Stepanova O. Search, isolation and study of Black sea algal viruses 2002-2013. New facts and hypotheses.– [Saarbrücken]: Lambert Academic Publishing, 2014.– 56 p. <https://www.ljpubljuknigi.ru/store/gb/book/search,-isolation-and-study-of-black-sea-algal-viruses-2002-2013/isbn/978-3-659-59460-1>

14. Степанова О.А., Бойко А.Л., Гордиенко А.И. и др. Характеристика вируса *Tetraselmis viridis* Norris (Chlorophyta, Prasinophyceae) // Доп. НАН України.– 2005.– № 1.– С.158-162.
15. Степанова О.А., Климчук Д.А., Новиченко В.Н. Первая изоляция альговируса *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) из черноморской среды // Доп. НАН України.– 2009.– № 11.– С.165-168.
16. Степанова О.А., Бойко А.Л., Щербатенко И.С. Компьютерный анализ геномов трех морских альговирусов // Микробиологический журнал.– 2013.– т.75, № 5.– С.76-81.
17. Овчинникова С.И., Широкая Т.А., Кривенко О.Г. Биохимические исследования беломорских мидий // Современные наукоемкие технологии.– 2008.– № 5.– С.45-46.
18. http://www.rusnevod.com/cgi-bin/rnev/start.cgi?mode=idxb&d0=2&d1=19&d2=midi_oby

Матеріал поступив в редакцію 27.10.2014 г.

АНОТАЦІЯ Експериментальним шляхом було встановлено утилізація (можливе засвоєння і концентрація в органах) альговірусів з води чорноморською мідією *Mytilus galloprovincialis* до 99 %, причому ця величина залежала від тривалості досліду і від складності морфології вірусу. Виявлено, що частина альговірусів, яка концентрується в організмі фільтруючих молюсків, повертається в навколишнє середовище з фекаліями, транспортуючи на дно, де може бути використана бентофагами або дифундувати назад в пелагіаль. Отримані результати свідчать, що мідії не тільки утилізують вірусну складову, а й виконують певну роль в циркуляції вірусів, переводячи їх з пелагіалі в бентосний біотоп.

ABSTRACT By experimental way it was found utilization (possible assimilation and concentration in organs) of algal viruses from the water by the Black Sea mussel *Mytilus galloprovincialis* to 99 %, and this value depends on the duration of the experience and complexity of the morphology of the virus. It was revealed that part of algal viruses concentrated by mussels returned to the environment in the feces and transported to the bottom, where viruses can be used by benthos phages or diffuse back into the pelagic. The received results indicate that mussels are not only utilizes the viral component of the microplankton, but also fulfill a role in the circulation of viruses, transferring them from the pelagic to benthic biotope.