

О. А. Степанова, Д. А. Климчук, В. Н. Новиченко

Первая изоляция альговируса *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) из черноморской среды*(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины А. Ф. Фроловым)*

*Впервые из проб воды та мідій *Mytilus galloprovincialis* Чорного моря ізольовано вірус мікрободорості *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) і визначено дев'ять його штамів — *Dunaliella viridis* Virus Solar I-1 (DvVSI-1), DvVSI-2, ..., DvVSI-9. Вірус стійкий до хлороформу, зберігає інфекційну здатність при розбавленні до 10^{-9} (інфекційний титр до 10^{10} од./мл). Віріони мають форму ікосаедра з діаметром 50–53 нм.*

В настоящее время установлена, но пока не полностью выяснена роль водных вирусов в экологии не только водоемов, но и биогеоценозов суши [1–3]. На основании данных литературы и результатов проведенного ранее эксперимента [4] была выдвинута гипотеза о циркуляции вирусов между сушей и гидросферой, что является фактором их эволюции и приводит к появлению так называемых новых вирусов [5], которые могут представлять биологическую опасность для живого, в том числе и для человека [6].

Особый интерес среди вирусов гидросферы представляют альговирусы, вызывающие лизис первичных продуцентов органической материи и кислорода в Мировом океане. Вирусоподобные частицы или вирусы обнаружены у 44 таксонов эукариотических водорослей среди 10 из 14 известных классов (типов) водорослей [7]. Для этих вирусов характерно наличие сходных, общих особенностей, что определяет их принадлежность к одному семейству Phycodnaeviridae [8]. Представители данного семейства — альговирусы (фикоднавирусы) — по форме отличаются большими икосаэдрическими частицами до 120–220 нм в диаметре, их НК обычно представлена двуспиральной ДНК (дсДНК), а размер генома может быть более 300 kb. Фикоднавирусы обладают сходными литическими циклами и узким кругом хозяев. В результате проведения молекулярных исследований создано филогенетическое дерево, отражающее их родственные связи [1]. Наиболее тесная связь отмечена между представителями семейства Phycodnaeviridae. Среди других крупных дсДНК-содержащих вирусов близкое генетическое родство выявлено с герпесвирусами, менее выраженная связь определена с покс- и бакуловирусами, а также с группой арбовирусов африканской лихорадки свиней. Таким образом, альговирусы имеют генетическое родство с патогенными для человека вирусами. Некоторые сообщения свидетельствуют об изоляции альговирусов, имеющих различия (размер вириона до 50 нм и меньше, РНК-содержащий геном, размер генома 23 kb и пр.) с ранее описанными представителями семейства Phycodnaeviridae [1–3, 9]. Несомненно, что не все альговирусы еще изучены и, вероятно, не все они имеют сходные характеристики.

Мониторинг альговирусов Черного моря на базе Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского (ИнБЮМ) НАН Украины проводится с 2002 г. В результате выделены и описаны новые альговирусы, хозяевами которых являются микроводоросли *Tetraselmis viridis* и *Pheodactylum tricornutum* [10–13]. Авторским запатентованным способом [14] аль-

говирус *Tetraselmis viridis* был изолирован и из моллюсков Норвежского моря [9]. С целью дальнейшего изучения разнообразия альговирюсов, как естественных обитателей черноморской среды, нами впервые проведен поиск вирусюв микроводоросли *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta).

Изоляцию альговирюсов микроводоросли *D. viridis* проводили авторским способом [14], изучая пробы морской воды и мантийной жидкости мидий *Mytilus galloprovincialis*. Исследуемый материал отбирали ежемесячно с сентября 2008 г. по февраль 2009 г. на взморье Севастополя (из четырех станций). Всего было исследовано 24 пробы морской воды и 6 проб из мидий. Подробное описание титрования выделенных альговирюсов и их накопления в больших объемах для дальнейших исследований изложено в [10–12, 14].

В качестве индикаторной культуры выбрана музейная культура одноклеточной морской водоросли *D. viridis* Teod. Var. Palmelloides (Chlorophyta, Chlorophyceae) из коллекции отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ НАНУ. Там же получены и культуры микроводорослей *Dunaliella salina*, *Tetraselmis viridis*, *Clorella vulgaris* и *Stichococcus bacillaris*, которые были использованы при изучении контакта с выделенными штаммами альговирюса *D. viridis* для определения их видоспецифичности. Культивирование водорослей проводили согласно соответствующим требованиям [15], используя стабилизирующую питательную среду Гольдберга.

Чувствительность альговирюсов к хлороформу определяли путем добавления 0,2 мл хлороформа к 2 мл вирусной суспензии и титрования через 1 ч после контакта опытной и контрольной (с добавлением к 2 мл суспензии 0,2 мл среды Гольдберга) суспензий путем последовательных разведений до 10^{-10} , что позволяло выявить возможное снижение инфекционности.

Морфологические характеристики альговирюса изучали в трансмиссионном электронном микроскопе TEM-1230 (“Jeol”, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Образцы контрастировали водным раствором 1% уранилацетата. Изучали как нативную (без предварительной обработки) вирусную суспензию, так и после предварительной очистки (5000 об/мин в течение 30 мин) и концентрирования (29000 об/мин в течение 60 мин) с последующей обработкой раствором 2,5% глутаральдегида. Очистку и концентрацию вирусюв осуществляли с использованием центрифужных роторов SW 25.2 и SORVALL AH-629 на базе Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины.

Изолированные из морской воды и черноморских мидий девять штаммов альговирюса *D. viridis* получили название *D. viridis* Virus Solar I-1 (DvVSI-1), DvVSI-2, DvVSI-3, DvVSI-4, DvVSI-5, DvVSI-6, DvVSI-7, DvVSI-8 и DvVSI-9.

При первоначальной изоляции штаммов альговирюса *D. viridis* латентный (инкубационный) период наблюдался до 3–7 сут. При последующих трех–четырех пассажах латентный период сокращался и устанавливался в пределах 20 ч. Инфекционный титр для изолированных штаммов доходил до 10^8 – 10^{10} инфекционных единиц в 1 мл суспензии. Обработка вирусных суспензий изучаемых штаммов хлороформом не приводила к изменению их инфекционного титра, что указывало на отсутствие суперкапсида. Все штаммы альговирюса *D. viridis* не проявляли литической активности по отношению к культурам микроводорослей *Dunaliella salina*, *Tetraselmis viridis*, *Clorella vulgaris* и *Stichococcus bacillaris*, что свидетельствовало об их узкой видовой специфичности.

При изучении в электронной микроскопии морфологии альговирюса *D. viridis*, проводимой на примере штамма DvVSI-2, вирионы наблюдали в виде частиц икосаэдрической формы с диаметром 50–53 нм (рис. 1).

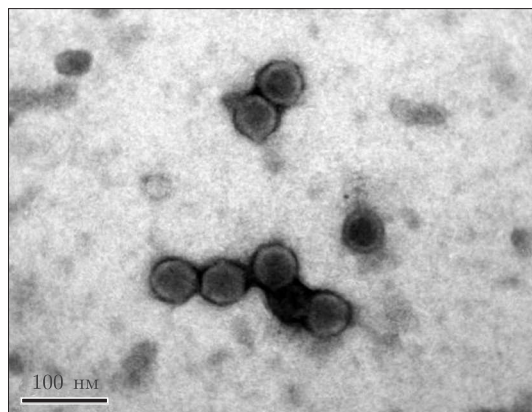


Рис. 1. Электронно-микроскопическое изображение вирионов DvVSI-2 (нативная вирусная суспензия) альговируса *Dunaliella viridis* Teod. из черноморской среды

Таким образом, в результате проведенных исследований впервые изолирован новый альговирус микроводоросли *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta), девять штаммов которого (DvVSI-1, DvVSI-2, DvVSI-3, ..., DvVSI-9) выделены из объектов черноморской среды (воды и мидий *Mytilus galloprovincialis*). При изучении свойств вируса установлен инфекционный титр до 10^8 – 10^{10} инфекционных единиц в 1 мл вирусной суспензии, определена устойчивость к хлороформу. В электронной микроскопии вирионы имели форму икосаэдра с диаметром 50–53 нм.

1. *Ecology of marine viruses* (Banyuls-sur-mer, 19–22 March, 2003). – Monaco, 2003. – 94 p.
2. Raven A. J. Aquatic viruses: the emerging story // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* – 2006. – **86**. – P. 449–451.
3. *Aquatic virus workshop* (July 6–11, 2008. – The University of British Columbia Vancouver, B. C., Canada). – Vancouver, 2008. – 65 p.
4. Степанова О. А. Адаптация бактериофагов *Xanthomonas axanopodis* к микроводоросли *Platymonas viridis* in vitro // *Вісн. Одес. нац. ун-ту.* – 2004. – **9**, вып. 5. – С. 128–132.
5. Бойко А. Л., Степанова О. А. Обмен вирусами суши и гидросферы – возможный путь их эволюции // *Микроорганизмы в экосистемах озер, рек, водохранилищ: Материалы II Байкальского микробиол. симп. с междунар. участием, Иркутск, 10–15 сент. 2007 г.* – Иркутск, 2007. – С. 27.
6. Бойко А. Л., Степанова О. А. Вирусы в Черном море и вопросы биобезопасности // *Тези V Міжнар. конф. “Біоресурси та віруси”, Київ, 10–13 вересня 2007 р.* – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 166.
7. Van Etten J. L., Lane L. C., Meints R. H. Viruses and virus-like particles of eukariotic algae // *Microbiol. rev.* – 1991. – **55**, No 4. – P. 586–620.
8. Castberg T. Algal viruses: Characteristics and ecological effects. – Bergen: Univ. of Bergen, 2001. – 204 p.
9. Степанова О. А., Heldal M., Sandaa R. A., Bratbak G. Первая изоляция вируса *Tetraselmis viridis* Virus (TvV-N1) из Норвежского моря // *Тези V Міжнар. конф. “Біоресурси та віруси”, Київ, 10–13 вересня 2007 р.* – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 193.
10. 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.
11. Степанова О. А., Бойко А. Л., Шевченко Т. П., Полищук В. П. Вирусы *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta), изолированные из Черного моря // *Вісн. Одес. нац. ун-ту.* – 2005. – **10**, вып. 7. – С. 349–355.
12. Степанова О. А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря. – Севастополь: Мир, 2004. – 308 с.
13. Зубик Ю. А., Шевченко Т. П., Степанова О. А., Полищук В. П. Деякі відомості по екології і біологічних властивостях чорноморських альговірусів *Phaeodactylum tricornutum* // *Тези V Міжнар. конф. “Біоресурси та віруси”, Київ, 10–13 вересня 2007 р.* – Київ: Фітосоціоцентр, 2007. – С. 174.
14. Пат. 65864А Україна, МКВ 7 С12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів одноклітинних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita) / О. А. Степанова. – № 2003065499; Заявл. 13.06.03; Опубл. 15.04.04, Бюл. № 4 // *Пром. власність.* – 2004. – № 4. – С. 1–4.

15. *Культивирование* коллекционных штаммов водорослей. Межвуз. сб. / Под ред. Б.В. Громова. – Ленинград, 1983. – 153 с.

*Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь
Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 17.04.2009

O. A. Stepanova, D. A. Klimchuk, V. N. Novichenko

First isolation of *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) virus from the Black Sea environment

*For the first time, virus of algae *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) (9 strains – *Dunaliella viridis* (DvVSI-1), DvVSI-2, . . . , DvVSI-9) is isolated from Black Sea (samples of marine water and mollusks *Mytilus galloprovincialis*). Virus is resistant to chloroform and has the infection activity of 10^{10} infection units in 1 ml of a virus suspension. Virions are icosahedral about 50–53 nm in diameter.*