

УДК 628.3:578.5,52(262.5)

О. А. Степанова, канд. мед. наук, науч. сотр.
Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
отдел биотехнологии и фиторесурсов,
99011, Украина, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2, тел. (0692)557813

АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *XANTHOMONAS AXANOPODIS* К МИКРОВОДОРОСЛИ *PLATYMONAS VIRIDIS* IN VITRO

Экспериментально подтверждена принципиальная возможность адаптации бактериофагов *Xanthomonas axanopodis* к новым условиям водной среды с освоением нового хозяина микроводоросли *Platymonas viridis*.

Ключевые слова: адаптация, бактериофаги, микроводоросль.

Высокая экологическая пластичность вирусов обеспечивает им возможность приспосабливаться к новым условиям, включая и освоение иной среды обитания и новых хозяев. По мнению ученых "новый вирус" — это вирус, получивший новые возможности и реализовавший их, в результате чего им могут приобретаться иные свойства и качества с сохранением либо потерей прежних [1, 2].

Биологическое загрязнение патогенными вирусами прибрежной зоны крупных портовых городов — это реалии нашей действительности. Со стоками в водоемы попадает большое количество различных вирусов человека, животных, растений и бактерий [3]. Проведенные ранее исследования выявили, что морская вода, донные осадки и фильтрующие моллюски прибрежной зоны Севастополя контаминированы рото-, рео-, адено- и энтеровирусами [4]. Было обнаружено, что жабры рыб бухт Севастополя загрязнены вирусами фитопатогенных бактерий [5]. Контаминация рыб бактериофагами фитопатогенных бактерий была в 7 раз выше в экологически неблагоприятных бухтах, чем в относительно чистых акваториях. К сожалению, мало сведений о влиянии попадающих в водоемы вирусов на водную среду и ее обитателей.

Целью наших исследований явилось изучение адаптации аллохтонных вирусов к морской среде с освоением нового хозяина. Задача проведенной работы — установить экспериментальным путем возможность адаптации бактериофагов фитопатогенных бактерий *Xanthomonas axanopodis* pv. *beticola* к микроводоросли *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta).

Материал и методы

Для проведения опытов по адаптации бактериофагов фитобактерий *Xanthomonas axanopodis* pv. *beticola* (штамм 7325) к морской микроводоросли *Platymonas viridis* Rouch (*Chlorophyta*) использованы четыре

вирусных изолята 7325-1/1, 7325-10/1, 7325-17/1 и 7325-4 в титре 10^7 – 10^8 бляшкообразующих единиц. Вирусные изоляты были получены на кафедре вирусологии Киевского национального университета имени Тараса Шевченко.

Культура одноклеточной морской водоросли *P. viridis* получена из музея микроводорослей Института биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины и поддерживалась в стабилизирующей питательной среде Гольдберга. Для экспериментов использовали культуру микроводоросли в стадии интенсивного роста с концентрацией не выше 10^4 кл/мл.

Адаптацию вирусов к культуре *P. viridis* проводили тремя способами. Каждому из способов предшествовал первоначальный пассаж предварительно разбавленных в 10 раз стерильной морской водой вирусов в культуру *P. viridis* в равных объемах (по 2 мл). Спустя месяц с момента контакта вируса и неспецифического хозяина проводили 3–5 слепых пассажей каждые 7–10 дней до появления ингибирующего эффекта культуры микроводорослей. Ингибирование проявлялось нарушением подвижности клеток, что сопровождалось появлением зеленого осадка в опытной пробирке и прозрачной надосадочной жидкости, тогда как в контроле наблюдали равномерный зеленый цвет. Дальнейшие пассажи проводили до установления инкубационного периода (до появления признаков ингибирования) продолжительностью до 20–24 часов с наблюдаемым лизисом клеток через 3–5 дней. Вторым способом адаптации заключался в последующем пассаже до проявления ингибирующего эффекта инфицированной микроводоросли хотя бы для одного из вирусов. Затем эффект ингибирования закрепляли в последующих пассажах до установления инкубационного периода. При третьем способе адаптации к первоначально инфицированной водоросли (в колбе) периодически, через каждые 10–15 дней, добавляли стабилизирующую питательную среду Гольдберга в количестве 10–50 мл и наблюдали. Иными словами, при последнем способе проводили длительное (около 2 месяцев) культивирование инфицированной одноклеточной морской водоросли *P. viridis*.

Результаты и их обсуждение

При проведении попытки адаптации бактериофагов фитопатогенных бактерий к морским микроводорослям одновременно были проведены три способа адаптации, описанные в разделе "Материал и методы". При этом наиболее быстрый результат ингибирования культуры водоросли *P. viridis* бактериофагами *H. axanopodis* был получен при серии слепых пассажей (первым способом). В таблице представлены результаты выполненной экспериментальной работы.

При проведении первого способа адаптации уже после третьего пассирования наблюдали ингибирование одноклеточной водоросли через 20–24 часа с последующим лизисом в течение 3–5 дней одним из изолятов (7325-17/1). Вирусные изоляты 7325-1/1 и 7325-4 вызы-

вали ингибирование культуры водоросли после четырех и пяти пассажей соответственно.

Таблица

Три способа адаптации бактериофагов *X. axanorodis* к морской одноклеточной водоросли *P. viridis* и время появления ингибирующего эффекта

Способ адаптации бактериофагов к водоросли	Вирусные изоляты и сроки появления эффекта ингибирования культуры <i>P. viridis</i> в результате инфицирования			
	7325-1/1	7325-10/1	7325-17/1	7325-4
Первый способ – слепые пассажи в свежую культуру водоросли через 7 - 10 дней	Первоначальный эффект ингибирования наблюдали после четвертого пассажа	Не проводили	Первоначальный эффект ингибирования наблюдали после третьего пассажа	Первоначальный эффект ингибирования наблюдали после пятого пассажа
Второй способ - длительный контакт бактериофагов и водоросли после второго пассажа	Первоначальный эффект ингибирования наблюдали через 50 дней после второго пассажа	После второго пассажа эффект ингибирования отсутствовал в течение 50 дней. Ингибирование наблюдали после третьего пассажа	После второго пассажа эффект ингибирования отсутствовал в течение 50 дней. Ингибирование наблюдали после третьего пассажа	После второго пассажа эффект ингибирования отсутствовал в течение 50 дней. Ингибирование наблюдали после третьего пассажа
Третий способ – длительное культивирование первоначально инфицированной бактериофагом культуры водоросли	Не проводили	Эффект ингибирования наблюдали через 90 дней культивирования инфицированной культуры водорослей	Не проводили	Эффект ингибирования отсутствовал в течение 90 и более дней культивирования инфицированной культуры водорослей

Второй способ — длительное наблюдение после второго пассажа вирусов в культуру *P. viridis* — позволил выявить через 50 дней ингибирующий эффект у одного из изолятов (7325-1/1). Однако при проведении третьего пассажа эффект ингибирования уже наблюдался для всех изолятов. При последующих пассажах инкубационный период сократился до 20–24 часов с проявлением лизиса через 3–5 дней.

Третий способ адаптации вирусов к морской микроводоросли — длительное культивирование первоначально инфицированной *P. viridis* — был выполнен для изолятов 7325-10/1 и 7325-4. Однако через 90 дней эффект ингибирования культуры водоросли, объем которой к тому времени уже достигал свыше 200 мл, наблюдали только в присутствии изолята 7325-10/1. Проявление ингибирования заключалось в оседании на дно водорослей, что свидетельствовало о нарушении

нии их подвижности, и в просветлении надосадочной жидкости. Эффект ингибирования не перерос в лизис культуры *P. viridis*. Продолжительность ингибирования не превышала 3–4 дня, в период которых эффект ингибирования с последующим лизисом был закреплен путем пассажей надосадочной жидкости в культуру *P. viridis*. Продолжительный опыт с проявившимся кратковременным ингибированием завершился постепенным оживлением культуры водоросли и ее последующим ростом. Возможно, что вирусная инфекция в данном случае перешла в лизогенную либо abortировала.

Первый способ адаптации бактериофагов *X. axanopodis* к новому хозяину — морской микроводоросли, заключающийся в проведении слепых пассажей в свежую культуру, является наиболее близким к естественным условиям морской среды. Вероятнее всего таких высоких концентраций вируса и водоросли *P. viridis*, которые были использованы в наших экспериментальных исследованиях, в природе не встречается. Однако эффект ингибирования с последующим лизисом культуры *P. viridis* адаптированными вирусными изолятами наблюдали и при предварительном их разведении до 10^{-8} в стабилизирующей питательной среде Гольдберга. Это дает нам основание предположить, что если в море произойдет попадание подобных вирусов (при смывании или со стоками), то при контакте с клетками *P. viridis* принципиально возможно инфицирование. В период цветения, приводящего к большому количеству этой водоросли, возможны последующие "естественные пассажи". Иными словами, при совпадении некоторых условий среды вирусы с суши, занесенные в открытые водоемы, способны переступить через видоспецифический барьер и приспособиться к новому хозяину. Два других способа адаптации бактериофагов к новому хозяину подтвердили принципиальную возможность преодоления вирусами генетических барьеров иного видового хозяина.

Инфицирование адаптированными в нашем эксперименте вирусными изолятами своего прежнего хозяина — возбудителя туберкулеза сахарной свеклы (*X. axanopodis*), проведенное классическим методом двуслойного агара [6], выявило отсутствие агрессивных свойств вирусов по отношению к культуре фитобактерии. Вероятно, произошли значительные изменения в свойствах вирусов, адаптированных к новому хозяину. Иными словами, в результате экспериментальной работы были получены "новые вирусы". Причиной появления этих "новых вирусов" были иные условия их существования, которыми они воспользовались в целях своего выживания и эволюционирования.

Выводы

Полученные нами в эксперименте результаты свидетельствуют о том, что аллохтонные вирусы, занесенные в море с суши, способны адаптироваться к водной среде и освоить нового хозяина. Таким образом, биологическое загрязнение водоемов вирусами с суши способствует появлению "новых" вирусов со всеми истекающими из этого

последствиями — патологией гидробионтов, их массовой гибелью, нарушением звеньев пищевой цепи и т. п., что в конечном итоге может привести к самым непредсказуемым экологическим катастрофам.

Литература

1. Львов Д. К. Методологические основы экологии вирусов / Методические проблемы вирусологии. — М.: Медицина, 1975. — С. 124–141.
2. Morse S. S. Emerging viruses: Defining the rules for viral traffic // *Perspect. Biol. med.* — 1991. — V. 34, № 3. — P. 387–409.
3. Gupta S. L., Nayyar M. P. A retrospective look at viruses of waste water // *Everyman's Sci.* — 1988. — V. 23, № 3. — P. 88–89.
4. Степанова О. А. Биологическое загрязнение морских акваторий — путь к эволюции патогенных вирусов // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. — 2001. — Т. 137, Ч. II. — С. 177–179.
5. Семчук Л. Г., Степанова О. А., Бойко А. Л., Андрійчук О. М. Виявлення фагів фітопатогенних бактерій в зябрах риб Чорного моря // *Вісник КНУ. Біологія.* — Випуск 41. — 2003. — С. 156–158.
6. *Практикум із загальної вірусології* / За ред. А. Л. Бойка. — К.: Видавничий центр "Київський університет", 2000. — 269 с.

О. А. Степанова

Інститут біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України,
99011, Україна, м. Севастополь, пр. Нахімова, 2.

АДАПТАЦІЯ БАКТЕРІОФАГІВ *XANTHOMONAS AXANOPODIS* ДО МІКРОВОДОРОСТІ *PLATYMONAS VIRIDIS* IN VITRO

Резюме

Експериментально підтверджена принципова можливість адаптації бактеріофагів *Xanthomonas axanopodis* до нових умов водного середовища з освоєнням нового хазяїна мікроводорості *Platymonas viridis*.

Ключові слова: адаптація, бактеріофаги, мікроводорість.

О. А. Stepanova

Institute of biology of the Southern Seas by A. O. Kovalevsky of National
Academy of Sciences of Ukraine,
99011, Ukraine, Sevastopol, av. Nahimov 2.

ADAPTATION OF BACTERIOPHAGES *XANTHOMONAS* *AXANOPODIS* TO MICROSEAWEED *PLATYMONAS VIRIDIS* IN VITRO

Summary

Principal possibility of bacteriophages *Xanthomonas axanopodis* adaptation to the new conditions of the water environment with mastering the new hoster-hydrobiont microseaweed *Platymonas viridis* has been confirmed experimentally.

Keywords: adaptation, bacteriophages, microseaweed.