

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ПИКОЦИАНОБАКТЕРИЙ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА В ПЕРИОД ЛЕДОСТАВА

А. И. Копылов, Д. Б. Косолапов, Е. А. Заботкина

*Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина РАН
Россия, 152742, Ярославская обл., Некоузский р-н, пос. Борок
E-mail: kopylov@ibiw.yaroslavl.ru*

Поступила в редакцию 18.03.15 г.

Вирусная инфекция пикоцианобактерий Рыбинского водохранилища в период ледостава. – Копылов А. И., Косолапов Д. Б., Заботкина Е. А. – На глубоководном и мелководных участках Рыбинского водохранилища в период ледостава при температуре воды 0.3 – 0.9°C численность вириопланктона и планктонных пикоцианобактерий изменялась в пределах $(37.1 - 84.1) \times 10^6$ (в среднем $(57.3 \pm 2.1) \times 10^6$) частиц/мл и $(13.5 - 75.0) \times 10^3$ (в среднем $(48.7 \pm 3.4) \times 10^3$) кл./мл соответственно. Количество пикоцианобактерий с прикрепленными к поверхности их клеток вирусами составляло 6.5 – 29.0% (в среднем $12.0 \pm 0.8\%$) их общей численности. Доля видимых инфицированных клеток составляла 0.7 – 7.6% (в среднем $2.2 \pm 0.3\%$) численности пикоцианобактерий. По-видимому, в период ледостава вирусы играют существенную роль в регулировании количества пикоцианобактерий.

Ключевые слова: пикоцианобактерии, вириопланктон, вирусиндуцированная смертность цианобактерий, период ледостава, Рыбинское водохранилище.

Viral infection of picocyanobacteria in the Rybinsk reservoir during the freeze-up period. – Kopylov A. I., Kosolapov D. B., and Zabolotkina E. A. – The virioplankton and planktonic picocyanobacteria abundances in the deep and shallow waters of the Rybinsk reservoir during the freeze-up period (the water temperature within 0.3 – 0.9°C) varied within $(37.1 - 84.1) \times 10^6$ ($(57.3 \pm 2.1) \times 10^6$ on the average) particles/ml and $(13.5 - 75.0) \times 10^3$ ($(48.7 \pm 3.4) \times 10^3$ on the average) cells/ml, respectively. The fraction of picocyanobacteria with viruses attached to their cell surface was 6.5 – 29.0% ($12.0 \pm 0.8\%$ on the average). The proportion of visible infected cells was 0.7 – 7.6% ($2.2 \pm 0.3\%$ on the average) of the numbers of picocyanobacteria. Apparently, viruses play an important role in the picocyanobacteria abundance regulation during the freeze-up period.

Key words: picocyanobacteria, virioplankton, virus-induced cyanobacteria mortality, freeze-up period, Rybinsk reservoir.

DOI: 10.18500/1684-7318-2017-2-128-135

ВВЕДЕНИЕ

Автотрофный пикопланктон (одиночные цианобактерии и водоросли размером менее 2 мкм) присутствует во всех типах пресноводных экосистем (Stockner, 1991). В большинстве из них концентрация пикоцианобактерий на порядок превышает таковую пиководорослей, и они являются основным компонентом автотрофного пикопланктона (Михеева, 1998).

Пикоцианобактерии (РС) являются важным компонентом планктонных трофических сетей и интенсивно потребляются гетеротрофными нанофлагеллятами,

инфузориями и многоклеточными тонкими фильтраторами (Callieri, Stockner, 2002). В водохранилищах Верхней Волги пикоцианобактерии являются важным компонентом планктона, и летом в результате вирусной инфекции и лизиса отмирает значительная их часть (Копылов и др., 2010). В период ледостава эти процессы не изучены, хотя бореальные водоёмы покрыты льдом в течение полугода.

Цель работы – определить уровень количественного развития вириопланктона и планктонных пикоцианобактерий, а также оценить степень зараженности пикоцианобактерий вирусами в период ледостава в условиях низких температур воды.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в Волжском плёсе Рыбинского водохранилища на одной глубоководной станции (ст. 1, 58°05.61′ с.ш., 38°18.04′ в.д.) и двух мелководных станциях (ст. 2, 58°05.77′ с.ш., 38°17.53′ в.д. и ст. 3, 58°08.83′ с.ш., 38°22.75′ в.д.). Пробы воды на каждой станции отбирали 2, 15, 26 февраля и 11, 27 марта 2008 г. плексигласовым батометром Руттнера объемом 0.5 л с 2-3 горизонтов водной толщи, в том числе из поверхностного (около 20 см подо льдом) и придонного (около 50 см над дном) слоев.

Планктонные вирусные частицы учитывали методом эпифлуоресцентной микроскопии с использованием красителя SYBR Green I и фильтров из оксида алюминия Anodisc («Wathman», США) с диаметром пор 0.02 мкм (Noble, Fuhrman, 1998). Численность пикоцианобактерий определяли методом эпифлуоресцентной микроскопии по автофлуоресценции пигментов в их клетках (MacIsaac, Stockner, 1993) на черных ядерных фильтрах с диаметром пор 0.2 мкм (ОИЯИ, г. Дубна, Россия). Вирусы и пикоцианобактерии подсчитывали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus BX51 («Olympus», Япония) с системой анализа изображений.

Для определения частоты отчетливо видимых инфицированных вирусами пикоавтотрофов (Frequency of visibly infected cells (*FVIC*), % общего количества пикоцианобактерий) и среднего количества зрелых фагов в инфицированных клетках (Burst size (*BS*), частиц/кл.) использовали метод просвечивающей электронной микроскопии. Вирусы и пикоцианобактерии осаждали центрифугированием при 100000g (35000 об./мин) в течение 1 ч при 4°C с использованием ультрацентрифуги OPTIMA L-90k («Beckman Coulter», США) с ротором 45Ti на никелевые сеточки для электронной микроскопии плотностью 400 мешей, покрытые пиолоформом с угольным напылением. Сеточки просматривали при увеличении в 50000 – 150000 раз в электронном микроскопе JEM 1011 («Jeol», Япония). Инфицированными считали клетки пикоавтотрофов, содержащие четыре и более зрелых фага.

В цикле вирусной литической инфекции бактериальных клеток выделяются две стадии: латентный период и лизис. Латентный период – это время от начала инфекции клетки до начала лизиса. Зрелые фаги появляются в клетке непосредственно перед лизисом, поэтому большую часть латентного периода вирусы в клетке невидимы. Доля (%) инфицированных клеток, содержащих хорошо видимые зрелые вирусы-цианофаги, в общей численности пикоцианобактерий (частота видимых инфицированных клеток, *FVIC*) – это важный параметр при изучении вирусов

и цианобактерий. Время от начала инфекции до первого появления видимых зрелых вирусных частиц называется эклипс-периодом. Эти частицы присутствуют в инфицированных бактериальных клетках от конца эклипс-периода до лизиса. Таким образом, доля всех инфицированных клеток (частота инфицированных клеток, *FIC*) в популяции пикоцианобактерий существенно выше *FVIC*. Было предложено оценивать *FIC* как произведение *FVIC* и отношения длительности эклипс-периода к длительности латентного периода (ε) (Proctor, Fuhrman, 1990). В наших расчетах мы принимали $\varepsilon = 0.75$ (Suttle, 2000; Mann, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глубина на глубоководном участке водохранилища находилась в пределах 9.5 – 10.6 м, на мелководных участках – в пределах 3.5 – 4.4 м (табл. 1). Прозрачность воды составляла 2.8 – 3.5 м, толщина льда – 40 – 60 см, слой снега на льду достигал 10 см. Значения pH воды были слабощелочными и находились в пределах 7.31 – 7.88 (в среднем 7.60), электропроводность – в пределах 374 – 400 (в среднем 385) мкСм/см. Температура воды колебалась от 0.3 до 0.9°C и была выше на глубоководной станции. Этот параметр был выше в марте (в среднем 0.67°C), чем в феврале (в среднем 0.54°C). Концентрация растворенного кислорода изменялась в пределах 7.3 – 11.3 (в среднем 9.1) мг/л. Заметной стратификации водной толщи в подледный период на исследованных участках водохранилища не наблюдалось.

Таблица 1

Характеристика исследованных станций отбора проб в Рыбинском водохранилище в феврале – марте 2008 г.

Дата	Толщина льда, см	Глубина, м	T^* , °C	O_2^{**} , мг/л	Электропроводность*, мкСм/см	pH
1	2	3	4	5	6	7
Станция 1						
02.02.08	40	10.6	0.8	$\frac{11.3}{8.8}$	374	7.31
15.02.08	42	10	0.8	$\frac{10.6}{9.6}$	382	7.74
26.02.08	57	9	0.8	8.9	377	7.63
11.03.08	48	9	0.8	$\frac{8.7}{8.8}$	382	7.61
27.03.08	45	9	0.9	$\frac{7.3}{8.0}$	392	7.61
Станция 2						
02.02.08	55	4.1	0.4	$\frac{11.3}{7.8}$	388	7.59
15.02.08	55	4	0.3	$\frac{9.7}{8.6}$	388	7.59
26.02.08	60	3.5	0.7	$\frac{9.4}{8.6}$	380	7.56
11.03.08	51	3.5	0.5	8.8	383	7.56
27.03.08	50	3.5	0.6	$\frac{8.3}{7.9}$	399	7.51

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ПИКОЦИАНОБАКТЕРИЙ

Окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
Станция 3						
02.02.08	55	4.4	0.3	<u>11.0</u> 7.9	382	7.70
15.02.08	55	4	0.3	<u>9.4</u> 9.2	388	7.89
26.02.08	57	3.7	0.5	<u>9.3</u> 8.9	379	7.63
11.03.08	52	3.7	0.7	<u>8.7</u> 8.7	382	7.58
27.03.08	54	4	0.5	<u>8.7</u> 7.4	400	7.55

Примечание. * – подо льдом (п/л); ** – над чертой – подо льдом (п/л); под чертой – над дном (н/д).

В период исследования численность вириопланктона (N_V) оказалась высокой (табл. 2). На глубоководном участке в столбе воды минимальные и максимальные значения N_V различались в 1.1 – 2.0 раза. Средняя для столба воды численность вирусов в феврале ($(57.2 \pm 3.6) \times 10^6$ частиц/мл) незначительно отличалась от таковой в марте ($(66.8 \pm 2.4) \times 10^6$ частиц/мл). На мелководных участках (станции 2 и 3) средние для столба воды значения N_V в феврале (соответственно $(56.1 \pm 2.2) \times 10^6$ и $(50.5 \pm 6.5) \times 10^6$ частиц/мл) также существенно не отличались от таковых в марте (соответственно $56.5 \pm 2.3 \times 10^6$ и $53.9 \pm 4.9 \times 10^6$ частиц/мл).

Таблица 2

Общее количество планктонных вирусов (N_V , 10^6 частиц/мл), численность пикоцианобактерий (N_{PC} , 10^3 кл./мл), численность пикоцианобактерий с прикрепленными к их клеткам вирусами (N_{APC} , % N_{PC}) и численность вирусов, прикрепленных к пикоцианобактериям (N_{VPC} , частиц/мл) в период ледостава в Рыбинском водохранилище (февраль – март 2008 г.)

Дата	Горизонт	N_V	N_{PC}	N_{APC}	N_{VPC}	N_{VPC}/N_V
1	2	3	4	5	6	7
Станция 1						
02.02.08.	п/л	53.55	61.7	7.4	11415	0.02
	5	51.40	58.0	8.3	14442	0.03
	10	61.9	59.9	29.0	34742	0.06
15.02.08	п/л	65.45	57.8	10.4	12012	0.02
	5	59.50	42.5	16.0	21080	0.04
	10	76.89	38.0	10.5	12369	0.02
26.02.08	п/л	47.60	58.1	9.8	10231	0.02
	5	39.52	44.7	7.5	5364	0.01
	10	59.79	35.9	12.7	6839	0.01
11.03.08.	п/л	37.08	47.7	9.1	6511	0.02
	5	62.77	75.0	7.3	6570	0.01
	10	65.45	15.5	17.7	5487	0.01
27.03.08.	п/л	73.78	34.5	15.9	6583	0.01
	5	77.35	17.9	10.7	3831	0.01
	10	84.07	18.7	18.4	5505	0.01

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7
Станция 2						
02.02.08.	п/л	46.41	65.0	10.1	9848	0.02
15.02.08	п/л	66.33	72.2	8.0	8670	0.01
	н/д	71.40	74.7	11.7	13110	0.02
26.02.08.	п/л	48.81	70.5	6.5	9165	0.02
	н/д	47.60	64.8	12.5	8910	0.03
11.03.08.	п/л	58.23	63.0	7.5	5059	0.01
	н/д	60.69	27.5	17.7	5534	0.01
27.03.08.	п/л	49.98	13.5	9.3	3967	0.01
	н/д	57.12	23.0	9.0	3105	0.01
Станция 3						
02.02.08.	п/л	39.27	63.4	7.0	8873	0.02
15.02.08	п/л	60.9	71.7	21.4	18413	0.03
	н/д	67.83	57.8	12.3	12086	0.02
26.02.08.	п/л	41.65	58.5	9.0	6318	0.02
	н/д	42.69	58.1	10.5	7324	0.02
11.03.08.	п/л	50.08	68.1	9.3	7603	0.02
	н/д	42.69	38.5	7.7	4447	0.02
27.03.08.	п/л	57.20	31.5	20.2	11453	0.02
	н/д	65.68	21.0	14.3	4204	0.01

Примечание. п/л – подо льдом, н/д – над дном.

Численность пикоцианобактерий (N_{PC}) на исследованных участках водохранилища оказалась невысокой и была на три порядка ниже численности планктонных вирусов (см. табл. 2). В феврале N_{PC} на всех станциях на разных глубинах отличалась не более чем в 1.6 раза, тогда как в марте минимальные значения этого параметра, обнаруженные в придонных горизонтах, были ниже максимальных в 1.5 – 4.8 раза. Средняя для столба воды N_{PC} на глубоководной станции 1 в феврале (50728 ± 3430 кл./мл) была выше таковой в марте (34883 ± 9488 кл./мл). На станциях 2 и 3 значения N_{PC} в среднем для столба воды в феврале (соответственно 69450 ± 1974 и 61900 ± 2654 кл./мл) также существенно превышали таковые в марте (соответственно 37500 ± 10818 и 39781 ± 10109 кл./мл). К поверхности значительной части PC были прикреплены вирусные частицы (см. табл. 2). Доля пикоцианобактерий с прикрепленными вирусами в N_{PC} в среднем за период исследования на глубоководном участке (станция 1) ($12.7 \pm 1.5\%$) оказалась немного выше таковой на мелководных участках ($10.2 \pm 1.1\%$ на станции 2 и $10.0 \pm 1.7\%$ на станции 3).

Количество вирусов, прикрепленных к одной пикоцианобактерии, достигало 11, а в среднем для пробы колебалось в пределах 1.2 – 3.0 вирусов. Численность вирусов-цианофагов, прикрепленных к клеткам цианобактерий, изменялась от 3831 до 34742 (в среднем 9426 ± 1189) частиц/мл, что составляло 0.01 – 0.06 (в среднем 0.02 ± 0.10) % N_V .

На глубоководной станции частота видимых инфицированных клеток пикоцианобактерий ($FVIC$) изменялась от 1.0 до 7.6% N_{PC} , составляя в среднем $2.9 \pm 0.5\%$ (табл. 3). Количество всех инфицированных пикоцианобактерий (FIC) находилось в пределах 3.0 – 22.8% (в среднем $8.8 \pm 1.4\%$) N_{PC} . Значения $FVIC$ и FIC

ВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ ПИКОЦИАНОБАКТЕРИЙ

в феврале (соответственно 4.0 ± 0.5 и $12.0 \pm 1.6\%$ N_{PC}) превышали таковые, обнаруженные в марте (соответственно 1.4 ± 0.2 и $4.2 \pm 0.3\%$ N_{PC}).

Таблица 3

Частота видимых инфицированных клеток пикоцианобактерий ($FVIC$, % N_{PC}),
частота инфицированных клеток пикоцианобактерий (FIC , % N_{PC})
и количество вирусных частиц внутри клеток пикоцианобактерий (BS , частиц/кл)

Дата	Горизонт	FVIC	FIC	BS	
				макс.	среднее
Станция 1					
02.02.08.	п/л	7.6	22.8	28	14±2
	5	4.3	12.9	298	132±58
	10	5.0	15.0	287	57±28
15.02.08	п/л	3.5	10.5	11	7±2
	5	3.0	9.0	8	7±0.6
	10	3.3	9.9	5	5
26.02.08	п/л	4.1	12.3	4	4
	5	2.7	8.1	163	39±31
	10	2.5	7.5	8	6±2
11.03.08.	п/л	1.5	4.5	6	5±0.4
	5	1.3	3.9	134	44±24
	10	1.4	4.2	5	4±0.3
27.03.08	п/л	1.9	5.7	4	4
	5	1.0	3.0	4	4
	10	1.0	3.0	21	10±4
Станция 2					
02.02.08	п/л	2.7	8.1	167	138±15
15.02.08	п/л	1.4	4.2	4	4
	н/д	2.4	7.2	20	8±4
26.02.08	п/л	2.2	6.6	4	4
11.03.08	п/л	0.7	2.1	5	4±1
	н/д	1.2	3.6	16	12±4
27.03.08	п/л	1.0	3.0	5	4±1
	н/д	0	0	0	0
Станция 3					
02.02.08	п/л	2.7	8.1	167	138±7
15.02.08	п/л	4.7	14.1	11	6±2
	н/д	2.5	7.5	35	8±5
26.02.08.	п/л	1.2	3.6	6	4±2
	н/д	1.0	3.0	31	17±8
11.03.08	п/л	1.4	4.2	56	16±12
	н/д	1.2	3.6	5	5
27.03.08	п/л	1.4	4.2	8	6±2
	н/д	0	0	0	0

Примечание. п/л – подо льдом, н/д – над дном.

На мелководных станциях 1 и 2 значения $FVIC$ и FIC колебались, соответственно, от 0 до 4.7% (в среднем $1.7 \pm 0.3\%$) N_{PC} и от 0 до 14.1% (в среднем $5.1 \pm 0.8\%$) N_{PC} . Зараженность пикоцианобактерий вирусами в марте ($FVIC = 0.86 \pm 0.20\%$ и $FIC = 2.58 \pm 0.61\%$ N_{PC}) также оказалась ниже, чем в феврале ($FVIC = 2.31 \pm 0.37\%$ и

$FIC = 6.93 \pm 1.10\% N_{PC}$). Между частотой видимых инфицированных пикоцианобактерий и численностью вирусов, прикрепленных к клеткам цианобактерий, наблюдалась положительная корреляция: $R = 0.55$, $p = 0.05$.

Таким образом, зараженность пикоцианобактерий вирусами снижалась в течение периода наблюдений от начала февраля к концу марта. Высокая вирусная инфекция пикоцианобактерий в феврале, по-видимому, была причиной их существенной смертности в этот период. Вследствие этого, а также, очевидно, отсутствия прироста численности пикоцианобактерий в марте, их количество значительно снизилось, а зараженность вирусами резко уменьшилась. В то же время лизис цианобактерий и сравнительно большое количество зрелых фагов внутри их клеток привели к поступлению во внешнюю среду свободных вирусов, что может быть одной из причин высокой численности свободных вирусов подо льдом.

В Рыбинском водохранилище численность вириопланктона в феврале, марте и июле отличалась незначительно, но численность пикоцианобактерий в период ледостава была в среднем в 3.1 раза ниже, чем летом (табл. 4). Доля видимых инфицированных клеток в N_{PC} и количество зрелых вирусов внутри клеток в феврале были существенно выше, а в марте – ниже, чем летом.

Таблица 4

Численность вириопланктона (N_V , 10^6 частиц/мл) и пикоцианобактерий (N_{PC} , 10^3 кл/мл), частота видимых инфицированных клеток пикоцианобактерий ($FVIC$, % N_{PC}) и количество зрелых цианофагов внутри клеток пикоцианобактерий (BS , частиц/кл) в июле 2007 г. и феврале – марте 2008 г.

Параметр	2008 г.		2007 г.
	Февраль	Март	Июль*
T , °C	0.3–0.8	0.5–0.9	22.2–22.3
N_V	55.18 ± 2.61 39.27–76.89	60.16 ± 3.46 37.08–84.07	51.48 ± 8.02 21.10–90.54
N_{PC}	58.59 ± 2.57 35.90–74.70	35.39 ± 5.48 13.50–75.00	161.57 ± 15.52 100.53–236.62
$FVIC$	3.2 ± 0.4 1.0–7.6	1.1 ± 0.1 0–2.4	2.4 ± 0.4 1.0–4.5
BS	33 ± 12 4–138	10 ± 3 4–44	20 ± 6 5–58

Примечание. В числителе – среднее $\pm$ ошибка среднего, в знаменателе – $min - max$; * – из работы А. И. Копылова с соавт. (2010).

ВЫВОДЫ

В Рыбинском водохранилище в период ледостава обнаружена высокая численность вириопланктона, соизмеримая с его численностью в вегетационный период. От февраля к марту доля инфицированных клеток среди пикоцианобактерий существенно снижалась, но в среднем за период исследования она была примерно такой же, как летом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Копылов А. И., Косолапов Д. Б., Заботкина Е. А., Страшкрабова В. Распределение пикоцианобактерий и вириопланктона в мезотрофном и мезоэвтрофном водохранилищах: роль вирусов в смертности пикоцианобактерий // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 6. С. 661 – 669.

Мухеева Т. М. Пико- и нанофитопланктон пресноводных экосистем. Минск : Изд-во Белорус. гос. ун-та, 1998. 196 с.

Callieri C., Stockner J. G. Freshwater autotrophic picoplankton : a review // J. of Limnology. 2002. Vol. 61, № 1. P. 1 – 14.

MacIsaac E. A., Stockner J. G. Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy // Handbook of methods in aquatic microbial ecology. Boca Raton : Lewis Publishers, 1993. P. 187 – 197.

Mann N. H. Phages of the marine cyanobacterial picophytoplankton // FEMS Microbiology Reviews. 2003. Vol. 27, № 1. P. 17 – 34.

Noble R. T., Fuhrman J. A. Use of SYBR Green for rapid epifluorescence count of marine viruses and bacteria // Aquatic Microbial Ecology. 1998. Vol. 14, № 2. P. 113 – 118.

Proctor L. M., Fuhrman J. A. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria // Nature. 1990. Vol. 343. P. 60 – 62.

Stockner J. G. Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems : the review from the summit // Intern. Review Hydrobiology. 1991. Vol. 76, iss. 4. P. 483 – 493.

Suttle C. A. Cyanophages // The Ecology of Cyanobacteria : Their Diversity in Time and Space / eds. B. A. Whitton, V. Potts. Dordrecht : Kluwer Academic, 2000. P. 563 – 589.