

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 315 (2016), 21 – 26

**STUDY OF VIRAL DIVERSITY
OF KAPCHAGAI RESERVOIR****M. S. Alexyuk, P. G. Alexyuk, A. P. Bogoyavlenskiy,
Zh. Zh. Zhumanov, E. S. Omirtayeva, V. E. Berezin**Institute of microbiology and virology, CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: virprot@mail.ru, anpav_63@mail.ru**Key words:** ecosystems, bioindication, metagenomic analysis, viruses.

Abstract. The increasing human pressure on the natural habitat increases the need to study the viral diversity of reservoirs, as virological studies of hydrosphere ecosystems are not only an important part of studying the biodiversity of environmental, but also one of the parameters of diagnosing the ecological status of aquatic ecosystems. The aim of this research was to study the diversity of allochthonous and autochthonous viruses of Kapchagai reservoir.

As a result of research using methods of metagenomic analysis, it was found that the virus composition of Kapchagai reservoir is represented not only a wide variety of autochthonous viruses specific to phytoplankton, but also representatives of allochthonous viruses indicates contamination by products of anthropogenic load. Thus, the use of metagenomic analysis of viruses as a method of bioindication can be a good tool for identifying new and unusual, including potentially dangerous to human, animal and plant viruses, and to assess the degree of water pollution as a result of anthropogenic load.

УДК 578.832

**ИЗУЧЕНИЕ ВИРУСНОГО РАЗНООБРАЗИЯ
КАПЧАГАЙСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА****М. С. Алексюк, П. Г. Алексюк, А. П. Богоявленский,
Ж. Ж. Жуманов, Э. С. Омиртаева, В. Э. Березин**

РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: экосистема, биоиндикация, метагеномный анализ, вирусы.

Аннотация. Возрастающая антропогенная нагрузка на естественную среду обитания увеличивает необходимость изучения вирусного разнообразия водоемов, так как вирусологические исследования экосистем гидросферы являются не только важной частью изучения биоразнообразия окружающей среды, но и одним из параметров диагностирования экологического состояния водных экосистем. Целью настоящих исследований было изучение разнообразия аллохтонных и автохтонных вирусов Капчагайского водохранилища.

В результате проведенных исследований с использованием методов метагеномного анализа было установлено, что состав вирусов Капчагайского водохранилища представлен не только широким разнообразием автохтонных вирусов, характерных для фитопланктона гидроэкосистем, но и представителями аллохтонных вирусов, что свидетельствует о загрязненности данного водоема продуктами антропогенной деятельности. Таким образом, использование метагеномного анализа вирусов в качестве метода биоиндикации может являться хорошим инструментом как для выявления новых и необычных, в том числе потенциально опасных для человека, животных и растений вирусов, так и для оценки степени загрязненности водоемов в результате хозяйственной деятельности человека.

Введение. Гидросфера как важнейший компонент биосферы планеты и источник ресурсов имеет глобальное экологическое, экономическое и социальное значение. Обеспеченность информацией о состоянии и динамике экологического баланса гидросферы все еще остается недостаточной и не отвечает современным требованиям устойчивого управления водными ресурсами, охраны окружающей среды и исследований в области глобальных изменений биосферы и климата планеты. Это связано с комплексом причин, основной из которых является незамкнутость системы, между ареалами которой существует тесная взаимосвязь, обуславливающая единство гидросферы и ее взаимодействие с другими геосферами [1]. Всестороннее изучение состояния экосистем гидросферы является актуальной проблемой биологических, медицинских, сельскохозяйственных и геолого-минералогических дисциплин. За последнее время доказано, что вирусы являются не только неотъемлемой частью существования всех экосистем, но и самой многочисленной группой организмов в любой экосистеме. Возрастающая антропогенная нагрузка на естественную среду обитания и разработка новых биотехнологических препаратов, в технологии производства которых используются микроорганизмы пресноводных и морских водоемов, увеличивает необходимость изучения вирусного разнообразия водоемов, т.к. при разработке подобных препаратов не учитываются проблемы биобезопасности, что может привести к появлению новых инфекционных заболеваний [2]. Вирусологические исследования экосистем гидросферы являются не только важной частью изучения биоразнообразия окружающей среды, но и одним из параметров диагностирования экологического состояния водных экосистем [3-5]. Целью настоящих исследований было изучение разнообразия аллохтонных и автохтонных вирусов Капчагайского водохранилища.

Материалы и методы. Сбор образцов производили в Капчагайском водохранилище недалеко от береговой линии города Капчагай, координаты места сбора $43^{\circ}52'53,5''$ северной широты, $77^{\circ}16'24,9''$ восточной долготы (рисунок 1).



Рисунок 1 – Место сбора образцов на Капчагайском водохранилище

Пробы воды из Капчагайского водохранилища были отобраны в летнее время, что соответствовало среднему количеству микрофлоры водоема в средне-сезонном значении. Отобранные пробы воды последовательно фильтровали через поликарбонатные фильтры (Millipore) с диаметром пор 1,2; 0,8; и 0,2 мкм с последующим осаждением методом ультрацентрифугирования. Из полученных образцов выделяли суммарную ДНК, которую затем анализировали методом полногеномного секвенирования на ДНК-секвенаторе «Illumina». Риды собирали программой «Edena», так как она позволяет варьировать минимальную длину общей части ридов, при которой они будут считаться пересекающимися. С целью нахождения наибольшего числа бактериофагов необходимое пересечение ридов было установлено в 35 нуклеотидов. Для поиска применяли программу «Blastn, NCBI», версия standalone 2.2.30. В качестве источника вирусных геномов использовалась база данных «NCBI nucleotide», содержащая 6079 полных геномов вирусов. Метагеномный анализ полученных результатов из 15501346 нуклеотидов проводили программами «MetaVIR» и «Crona» [6-8].

Результаты и обсуждение. Изучение разнообразия вирусов Капчагайского водохранилища с помощью метагеномного анализа показало, что среди обнаруженных 36102 вирусов 2% были представлены аллохтонными и 98% автохтонными вирусами (рисунок 2).

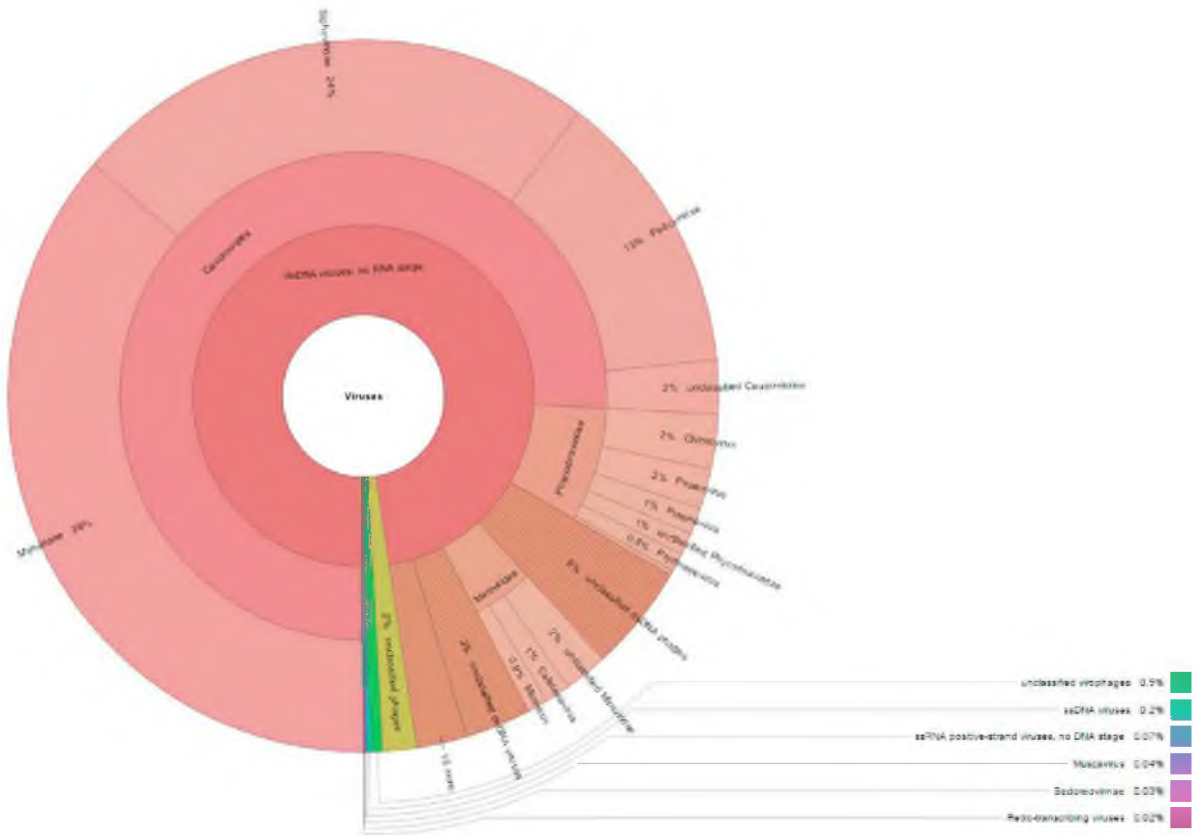


Рисунок 2 – Разнообразие вирусов Капчагайского водохранилища

Автохтонные вирусы являются паразитами основных обитателей нано- и пикопланктона: бактерий, простейших и микроводорослей. Вирусы простейших были представлены семейством *Mimiviridae* и составляли около 6,5%, из которых 1% включал представителей рода *Cafeteriavirus* и 0,9 % - рода *Mimivirus*. Вирусы бактерий были представлены отрядом *Caudovirales* (хвостатые фаги), состоящим из семейств: *Podoviridae* (13%), *Siphoviridae* (24%) и *Myoviridae* (36%). Также были обнаружены вирусы семейства *Phycodnaviridae*. Члены данного семейства инфицируют эукариотические водоросли, что делает их интересными с точки зрения их экологической функции. Имеются данные о том, что вирусы данного семейства являются активными участниками в инициации процессов начала и прекращения цветения воды [9]. Следует отметить, что более 10% вирусов остались неклассифицированными, т.е. они ранее не были описаны в доступной литературе и не содержатся в информационных базах данных.

При изучении разнообразия вирусов в Капчагайском водохранилище настораживает тот факт, что, несмотря на кажущуюся малочисленность, всего 2%, среди аллохтонных вирусов диагностированы вирусы различных семейств, способных вызывать инфекции человека, животных и растений, что говорит о выраженном антропогенном влиянии на гидросферу водохранилища.

Так, метагеномный анализ генетического материала, выделенного из исследуемых проб воды, показал наличие семейств *Coronavirinae*, *Mesoniviridae* и *Retroviridae* (рисунок 3, 4).

Семейство коронавирусов было представлено подсемейством *Coronavirinae*, включающим РНК-содержащие плеоморфные вирусы средней величины. Было обнаружено два рода: *Betacoronavirus* (7 видов) и *Gammacoronavirus* (2 вида).

Генетический материал рода *Betacoronavirus* принадлежал вирусу *Human coronavirus HKU1*. Данный вирус способен вызывать острые воспалительные процессы дыхательных путей, и был



Рисунок 3 – Нидовирусы Капчагайского водохранилища



Рисунок 4 – Ретровирусы Капчагайского водохранилища

впервые выделен в 2005 году в Гонгконге из носоглоточных смывов 71-го летнего мужчины, госпитализированного с диагнозом двусторонняя пневмония с острой лёгочной недостаточностью [10].

Род *Gammacoronavirus* был представлен коронавирусом белухи К1. Данный вирус был впервые выделен в 2008 году от 13 летней особи белухи, погибшей в результате генерализованной лёгочной инфекции [11].

Семейство *Mesoniviridae* – это новое семейство вирусов комаров, обнаруженное в 2011 году в странах юго-восточной Азии. Два вида этого семейства, выявленные в водных пробах Капчагайского водохранилища – вирус *Meno* и вирус *Hana*, были впервые выделены и описаны в 2013 году. Вирусы данного семейства имеют сферическую форму, диаметром 60–80 нм, генетический материал данных вирусов представлен позитивной, одноцепочечной линейной РНК [12].

Семейство *Retroviridae* в собранных образцах было представлено двумя подсемействами: *Orthoretrovirinae* и *Spumaretrovirinae*. Подсемейство *Orthoretrovirinae* включало три вида вирусов: вирус иммунодефицита кошки, ретровирус рыбы змейголовой и эндогенный вирус бабуинов.

Подсемейство *Spumaretrovirinae* (или пенящиеся вирусы) представляет собой оболочечные вирусы с двунитовой молекулой ДНК. Это подсемейство вирусов имеет широкое распространение и поражает сельскохозяйственные виды домашних животных. В пробах воды из Капчагайского водохранилища было обнаружено два вида данного подсемейства: пенящийся вирус крупного рогатого скота и пенящийся вирус лошадей. Данное подсемейство вирусов впервые было описаны в 1954 году и выделены в 1971. Данные вирусы очень распространены и поражают различных представителей млекопитающих [13].

Также биоинформатическая обработка полученного генетического материала показала наличие вируса гепатита сурков (*Woodchuck hepatitis virus*), который является первым представителем гепадновирусов млекопитающих и птиц, описанных после открытия вируса гепатита В [14].

Таким образом, метагеномный анализ состава вирусов Капчагайского водохранилища показал не только широкое разнообразие автохтонных вирусов, характерных для фитопланктона гидроэкосистем, но и свидетельствует о загрязненности данного водоема продуктами антропогенной деятельности. Использование метагеномного анализа вирусов в качестве метода биоиндикации может являться хорошим инструментом как для выявления новых и необычных, в том числе потенциально опасных для человека, животных и растений вирусов, так и для оценки степени загрязненности водоемов в результате хозяйственной деятельности человека.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Черновский Л.А. Учение о гидросфере: Учеб. пособие. Новосибирск: СГГА, 2008. 172 с.
- [2] Шуйский В.Ф., Максимова Т.В., Петров Д.С. Биоиндикация качества водной среды, состояния пресноводных экосистем и их антропогенных изменений // Сб. научн. докл. VII междунар. конф. "Экология и развитие Северо-Запада России" – С.-Петербург, 2–7 авг. 2002 г. – 2002 г.
- [3] Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems // Microbiology and Molecular biology reviews. – 2000. – Vol. 64. – P. 69-114.
- [4] Djikeng A., Kuzmickas R., Anderson N.G., Spiro D.J. Metagenomic Analysis of RNA Viruses in a Fresh Water Lake // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4. – e7264.
- [5] Sorensen G. The role of the virus-phytoplankton system in marine biogeochemical cycling: possible impacts of climate change // The Plymouth Student Scientist. – 2009. – Vol. 2, N 2. – P. 289-302.
- [6] Roux S., Tournayre J., Mahul A., Debros D., Enault F. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis // BMC Bioinformatics. – 2014. – Vol. 15. – P. 76-88.
- [7] Hernandez D., François P., Farinelli L., Ssterås M., Schrenzel J. De novo bacterial genome sequencing: Millions of very short reads assembled on a desktop computer // Genome Res. – 2008. – Vol. 18(5). – P. 802-809.
- [8] Ondov B.D., Bergman N.H., Phillippy A.M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser // BMC Bioinformatics. – 2011. – Vol. 12. – P. 385-394.
- [9] Larsen J.B., Larsen A., Bratbak G., Sandaa R.A. Phylogenetic Analysis of Members of the Phycodnaviridae Virus Family, Using Amplified Fragments of the Major Capsid Protein // Gene Applied and environmental microbiology. – 2008. – Vol. 74, N 10. – P. 3048-3057.
- [10] Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L., Kahn J.S. Coronavirus HKU1 Infection in the United States // Emerg Infect Dis. – 2006. – Vol. 12(5). – P. 775-779.
- [11] Mihindikulasuriya K.A., Wu G., Leger J.St., Nordhausen R.W., Wang D. Identification of a novel Coronavirus from a Beluga Whale by using a Panviral Microarray // J Virol. – 2008. – Vol. 82(10). – P. 5084-5088.
- [12] Vasilakis N., Guzman H., Firth C., Forrester N.L., Widen S.G., Wood T.G., Rossi S.L., Ghedin E., Popov V., Blasdel K.R., Walker P.J., Tesh R.B. Mesoniviruses are mosquito-specific viruses with extensive geographic distribution and host range // Virology Journal. – 2014. – Vol. 11. – 97 p.

- [13] M. L. Linal Foamy Viruses Are Unconventional Retroviruses // J. Virol. – 1999. – Vol. 73. – P. 1747-1755.
[14] Tennant B.C., Gerin J.L. The woodchuck model of hepatitis B virus infection // ILAR J. – 2001. – Vol. 42(2). – P. 89-102.

REFERENCES

- [1] Chernovskij L.A. Uchenie o gidrosfere ucheb. Posobie. Novosibirsk: SGGA, 2008. 172 s. (Russ.)
[2] Shujskij V.F., Maksimova T.V., Petrov D.S. Bioindikacija kachestva vodnoj sredy, sostojanija presnovodnyh jekosistem i ih antropogennyh izmenenij. Sb. nauchn. dokl. VII mezhdunar. konf. "Jekologija i razvitie Severo-Zapada Rossii". S.-Peterburg, 2–7 avg. 2002 g. – 2002 g. (Russ.)
[3] Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems, Microbiology and Molecular biology reviews. 2000. Vol.64. P. 69-114.
[4] Djikeng A., Kuzmickas R., Anderson N.G., Spiro D. J. Metagenomic Analysis of RNA Viruses in a Fresh Water Lake, PLoS ONE. 2009. Vol.4. e7264.
[5] Sorensen G. The role of the virus-phytoplankton system in marine biogeochemical cycling: possible impacts of climate change, The Plymouth Student Scientist. 2009. Vol. 2, № 2. P.289 - 302.
[6] Roux S., Tournayre J., Mahul A., Debroas D., Enault F. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis, BMC Bioinformatics. 2014. 15:76-88.
[7] Hernandez D., François P., Farinelli L., Ssteràs M., Schrenzel J. De novo bacterial genome sequencing: Millions of very short reads assembled on a desktop computer, Genome Res. 2008. Vol. 18(5). P. 802-809.
[8] Ondov B.D., Bergman N.H., Phillippy A.M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser, BMC Bioinformatics. 2011. Vol. 12. P. 385-394.
[9] Larsen J.B., Larsen A., Bratbak G., Sandaa R.A. Phylogenetic Analysis of Members of the Phycodnaviridae Virus Family, Using Amplified Fragments of the Major Capsid Protein Gene Applied and environmental microbiology. 2008. Vol. 74, N 10. P. 3048-3057.
[10] Esper F., Weibel C., Ferguson D., Landry M.L., Kahn J.S. Coronavirus HKU1 Infection in the United States. Emerg Infect Dis. 2006. Vol. 12(5). P. 775-779.
[11] Mihindukulasuriya K.A., Wu G., Leger J.St., Nordhausen R.W., Wang D. Identification of a novel Coronavirus from a Beluga Whale by using a Panviral Microarray. J Virol. 2008. Vol. 82(10). P. 5084-5088.
[12] Vasilakis N., Guzman H., Firth C., Forrester N.L., Widen S.G., Wood T.G., Rossi S.L., Ghedin E., Popov V., Blasdel K.R., Walker P.J., Tesh R.B. Mesoniviruses are mosquito-specific viruses with extensive geographic distribution and host range. Virology Journal. 2014. Vol. 11. 97 p.
[13] M. L. Linal Foamy Viruses Are Unconventional Retroviruses. 1999. J. Virol. Vol. 73. P. 1747-1755.
[14] Tennant B.C., Gerin J.L. The woodchuck model of hepatitis B virus infection. ILAR J. 2001. Vol. 42(2). P.89-102.

ҚАПШАГАЙ СУ ҚОЙМАСЫНЫҢ ВИРУСТЫҚ ӘРТҮРЛІЛІГІН ЗЕРТТЕУ

М. С. Алексюк, П. Г. Алексюк, А. П. Богоявленский,
Ж. Ж. Жуманов, Э. С. Омиртаева, В. Э. Березин

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы, Қазақстан

Түйін сөздер: экожүйе, биоиндикация, вирустар, метагеномды талдау.

Аннотация. Табиғи тіршілік ортаға ұлғаймалы антропогендік жүктеме су айдындарында вирустық әртүрлілікті зерттеу қажеттілігін арттырады, өйткені гидросфераның экожүйелерін вирусологиялық зерттеуі қоршаған ортаның биоалуантүрлілігін зерттеуде ғана маңызды емес, сонымен қатар су экожүйесінің экологиялық жай-күйін диагностикалаудағы параметрлері болып табылады. Осы зерттеулердің мақсаты Қапшағай су қоймасының аллохтонды және автохтонды вирустардың әртүрліліктерін зерттеу.

Метагеномды талдау әдістерін пайдалана отырып жүргізілген зерттеулер нәтижесінде Қапшағай су қоймасының вирустар құрамы гидроэкожүйе фитопланктондарына тән автохтонды вирустардың кең түрлігімен ғана емес, сонымен қатар осы су қоймасы антропогенді қызмет арқасында ластануын дәлелдейтін аллохтонды вирустардың болуын анықтады. Осылайша, биоиндикация әдісі ретінде вирустардың метагеномды талдауын пайдалану жаңа және ерекше түрлерін, сонымен қатар адамға, жануарларға және өсімдіктерге қауіпті вирустарды табуға, сондай-ақ адамның шаруашылық қызметі нәтижесінде су қоймаларының ластану дәрежесін бағалауда жақсы құрал болып табылады.

Поступила 04.05.2016 г.