

УДК 578.4(262.5):681.3.06:535.8

## МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ЭКСПЕРИМЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЧЕРНОМОРСКИХ АЛЬГОВИРУСОВ

© 2021 г. О. А. Степанова<sup>1</sup>, \*, П. В. Гайский<sup>1</sup>, С. А. Шоларь<sup>2</sup>, \*\*

<sup>1</sup>Институт природно-технических систем РАН, Севастополь 299011, Россия

<sup>2</sup>Морской гидрофизический институт РАН, Севастополь 299011, Россия

\*e-mail: solar-ua@ya.ru,

\*\*e-mail: sa.sholar@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2019 г.

После доработки 24.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

В России основные исследования альговирuсов Чёрного моря проводятся на базе научных институтов, находящихся в г. Севастополь. Анализ методологических подходов, использованных в 2002–2019 гг., показал, что в ходе поиска, изоляции и изучения альговирuсов применимы как классические вирусологические методики, так и методы, разработанные и запатентованные недавно, в том числе авторами обзора. Исследование проб клинического материала и материала от гидробионтов, а также проведение модельных экспериментов, в том числе с использованием уникальной лабораторной установки и экспериментального стенда, позволили получить новые данные о биологии и экологии морских вирусoв. На основании результатов этих исследований предложено использовать мониторинг альговирuсов как составляющую экомониторинга изучаемых акваторий, рассматривая альговирuсы в качестве биологических индикаторов и/или маркёров.

*Ключевые слова:* альговирuсы, микроводоросли, вирусный лизис, Чёрное море, лабораторная установка, экспериментальный стенд

**DOI:** 10.31857/S0134347521010095

С относительно недавнего времени вирусy гидросферы представляют особый интерес для ученых, оценивающих их как важнейших игроков в глобальной экологии и как одну из главных движущих сил биогеохимических циклов (Wommack, Colwell, 2000; Proposal for..., 2005; Suttle, 2007; Middelboe, Brussaard, 2017; Viruses of Microorganisms..., 2018). И хотя значимость морских (водных) вирусoв очевидна, на многие вопросы пока нет ответа, поскольку не все процессы в вирусной экологии изучены (Лихошвай, 2016; Степанова, 2018a; Viruses of Microorganisms..., 2018).

Материалы и методы, используемые зарубежными коллегами в морской (водной) вирусологии, подробно изложены в руководстве по экологии водных вирусoв (Manual of..., 2010). В этой работе наряду с классическими общепринятыми методиками поиска и изучения вирусoв гидросферы приведены сложные методы (например, генетический анализ), которые требуют применения дорогостоящей аппаратуры и материалов. Использование тех или иных методов зависит от поставленных целей и задач, которые, в свою очередь, ограничены условиями лабораторных экспериментов и уровнем оснащённости научных подразделений.

Исследования в области морской вирусологии активно ведутся в США, Канаде, Японии и странах западной Европы. Сообщество морских (водных) вирусологов регулярно проводит международные семинары, конференции, встречи по обмену информацией и опытом, а также публикует общие материалы (Proposal for..., 2005; Manual of..., 2010; Viruses of Microorganisms..., 2018). По результатам изучения морских (водных) вирусoв опубликован ряд обзоров (Wommack, Colwell, 2000; Степанова, 2004; Stepanova, 2005; Middelboe, Brussaard, 2017, и др.).

В России исследования по водной вирусологии проводятся в Лимнологическом институте СО РАН (г. Иркутск), в Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина (пос. Борок) и в Институте природно-технических систем (ИПТС) (г. Севастополь). В Лимнологическом институте с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) изучены сезонная динамика, морфологическое разнообразие и распределение бактериофагов в озерах Байкал (Россия) и Хубсугул (Монголия) (см.: Дрюккер и др., 2006, 2008, 2011; Дрюккер, Дутова, 2006, 2009; Дутова, Дрюккер, 2009, 2013). В Институте биологии внутренних вод выполнены электронно-микроскопические исследования проб воды для описа-

ния морфологии, определения численности и изучения роли водных вирусов (бактериофагов) в структуре и функционировании микробных сообществ пресноводных экосистем (Копылов и др., 2007, 2008, 2010, 2011; Копылов, 2013).

Открытие альговирусов, заражающих эукариотические водоросли, обусловило появление новых вопросов. Например, как эти вирусы влияют на первичную продукцию водных организмов, какова их роль в экологии и эволюции водорослей и т.д. В настоящее время описано 65 сохраняемых в коллекциях вирусов эукариотических водорослей (Coy et al., 2018; Viruses of Microorganisms..., 2018). На основе экспериментальных данных исследован процесс вирусного лизиса с использованием микробиоты тихоокеанских регионов (альговирусы и микроводоросли) с экстраполяцией некоторых полученных результатов на гидросферу (Balch et al., 2002; Simis et al., 2005, 2007; Uitz et al., 2010). Обнаруженные в условиях эксперимента характерные изменения, возникающие в ходе вирусного лизиса, предложено использовать для индикации этого процесса и для выявления массовой смертности одноклеточных хозяев в водоемах с помощью оптического дистанционного зондирования. До настоящего времени роль вирусов и вирусного лизиса в изменении физических характеристик их водной среды обитания не рассматривали, они также не учитывались в качестве активных компонентов физики и оптики моря и гидросферы в целом (Степанова, 2018а). Этот аспект морской вирусологии остается недостаточно изученным в теории и практике физики и оптики моря.

Морская вирусология как новое научное направление развивалась с 1994 г. на базе Института биологии южных морей (ИнБЮМ), в дальнейшем исследования были продолжены в ИПТС (Степанова, 2001, 2004, 2005, 2007, 2016, 2017а, 2017б, 2018б, 2018в; Степанова и др., 2005, 2009, 2013, 2018; Stepanova, 2005, 2014; Степанова, Стельмах, 2017).

С 2000-х гг. основные исследования нацелены на поиск, изоляцию и изучение альговирусов, интерес к которым связан со значимостью их хозяев — представителей фитопланктона. С помощью методов, запатентованных авторами настоящего обзора (Декларационный патент..., 2004; Патент..., 2012), за период 2002–2019 гг. исследовано более тысячи проб, из которых выделено свыше 300 штаммов альговирусов семи видов микроводорослей и изолированы штаммы цианофага одного вида цианобактерий. В 2007 г. предложенный авторами метод апробирован на базе Бергенского университета для выделения альговирусов из полевого материала (морская вода и моллюски), отобранного в Норвежском море (Pagarete et al., 2015). Получены электронно-микроскопические изображения (фото) альговирусов пяти видов черноморских микроводорослей (Степанова, 2004, 2016; Степанова и др., 2005, 2009; Шоларь,

Степанова, 2010, 2019). В соответствии с международной программой по проекту “Marine Phage, Virus & Virome Sequencing Project” (Broad Institute, MIT, USA) три вирусных штамма изучены на генетическом уровне; информация представлена в базах данных CAMERA (Community Cyberinfrastructure for Advanced Marine Microbial Research and Analysis) и NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Степанова и др., 2013; Stepanova, 2014). В результате модельных экспериментов получены новые сведения о роли вирусного лизиса в изменении электрической проводимости (ЭП) морской воды, показана необходимость учета морских вирусов и вирусного лизиса в физике и оптике моря (Степанова, Гайский 2018; Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019).

Таким образом, несмотря на очевидную актуальность научного направления морской (водной) вирусологии в области исследования альговирусов, в России в период 2002–2019 гг. основной опыт по поиску, изоляции и изучению вирусов микроводорослей с определением их роли и значения в экологии Черного моря был получен и накоплен в научных учреждениях г. Севастополь. Исходя из этого и учитывая возможность самостоятельного освоения методологических подходов, использованных в ходе этих исследований, мы приводим краткий обзор и общую характеристику методов поиска морских вирусов в пробах полевого материала, а также изоляции и изучения альговирусов Чёрного моря, рассчитывая на повышение интереса ученых к проблемам морской вирусологии.

#### *Исследованный материал и подготовка проб для изоляции альговирусов*

Изоляцию альговирусов проводили по запатентованным авторским методикам (Декларационный патент..., 2004; Патент..., 2012) из проб морской воды и донных отложений (грунтов), из мантийной жидкости мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) и из суспензии жабр рыб разных видов.

Пробы отбирали в закрытых и открытых бухтах южного и юго-западного Крыма, в том числе в бухтах в районе Севастополя. В 2019 г. на наличие альговирусов исследовали донные отложения, отобранные по всему периметру побережья п-ва Крым, в том числе в Азовском море, а также у прилегающего черноморского побережья у городов Анапа, Туапсе, Сочи и Геленджик.

В 2008 г. альговирусы были изолированы в ходе исследования клинического материала, полученного от людей, заболевших после пребывания на черноморских курортах (Stepanova et al., 2011; Stepanova, 2014). Таким образом, была подтверждена выдвинутая авторами гипотеза о циркуляции вирусов между сушей и гидросферой. В результате циркуляции происходит освоение новой

экологической ниши и появляются “новые” вирусы, патогенные для флоры и фауны нашей планеты. Например, известны данные, свидетельствующие о роли вирусов гидросферы в патологии психики млекопитающих (Yolken et al., 2014).

Для изоляции альговирусов обычно используют полевой материал, в основном пробы морской воды, поэтому более подробно мы остановимся на особенностях отбора и подготовки проб.

Пробы морской воды отбирали у кромки берега на небольшой глубине (10–30 см от поверхности) при помощи стеклянной емкости (банки) объемом 200–300 мл, в ряде случаев – ведром с борта экспедиционного судна. Воду в бутылках объемом 200–300 мл доставляли в лабораторию. Для заражения соответствующих культур микроводорослей использовали по 2.0 мл пробы воды без предварительной обработки. Для увеличения возможности изоляции альговирусов микроводорослей некоторых видов, обладающих физиологическими особенностями, пробу воды использовали повторно, сохраняя ее на рассеянном свете при комнатной температуре в течение 7–20 сут (Патент..., 2012).

Мантийную жидкость у особей *M. galloprovincialis* отбирали, приоткрыв створки моллюска. В одной пробе объединяли материал от нескольких моллюсков из одного местообитания. Мантийную жидкость в объеме около 2.0 мл отстаивали в течение  $\leq 1$  ч или центрифугировали. Из-за высокой концентрации вирусов в этих пробах для изоляции альговирусов использовали 0.5–1.0 мл надосадочной жидкости (Степанова, 2004, 2017а).

Из жабр рыб готовили 10–30% суспензию на морской стерильной воде или среде Гольдберга, которую также отстаивали в течение  $\leq 1$  ч или центрифугировали (Степанова, 2004, 2007; Степанова, Кузьминова, 2006). Для исследований использовали 0.2 мл надосадка приготовленной суспензии.

Известно, что численность вирусов в донных отложениях на порядки выше, чем в микропланктоне (Степанова, 2001, 2004). Из проб донных отложений (грунта) готовили 10% болтушку на морской стерильной воде или среде Гольдберга, затем надосадочную жидкость отстаивали в течение  $\leq 1$  ч или центрифугировали; для исследований использовали 1.0 мл надосадочной жидкости.

#### Метод изоляции черноморских альговирусов

В основе методик выделения альговирусов из проб полевого материала лежит известное свойство вирусов вызывать лизис у их одноклеточных хозяев (бактерий, микроводорослей). Вирусный лизис приводит к повышению прозрачности и изменению цвета жидкой среды, в которой происходит контакт вирусов и их хозяев. Это свойство, проявление которого можно наблюдать визуально и с помощью специальных оптических приборов, авторы использовали при создании простых

и доступных методов изоляции альговирусов черноморских микроводорослей (Декларационный патент..., 2004; Патент..., 2012).

Для изоляции альговирусов в бактериологические лабораторные пробирки пипеткой вносили 2.0 мл исследуемой пробы морской воды (0.2, 0.5–1.0 или 1.0 мл проб, приготовленных из жабр рыб, мантийной жидкости мидий или донных отложений соответственно) и добавляли 2.0 мл жидкой культуры микроводоросли в логарифмической стадии роста в стабилизирующей среде Гольдберга. В контроле 2.0 мл культуры микроводоросли вносили в 2.0 мл пастеризованной или стерильной морской воды или в такой же объем стабилизирующей среды Гольдберга.

В исследованиях использовали жидкие культуры микроводорослей *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980; *Dunaliella viridis* Teodoresco, 1905; *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin, 1897; *Prorocentrum pusillum* (Schiller) Dodge & Bibby, 1973; *Isochrysis galbana* Parke, 1949; *Emiliania huxleyi* (Lohmann) Hay & Mohler, 1967; *Stichococcus bacillaris* Nägeli, 1849; *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, 1905 и *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck], 1890, полученные из отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ. Этот же отдел института предоставил жидкую культуру цианобактерий *Synechococcus* sp. (BS 9001 4/М). В 2016 г. для изоляции черноморских альговирусов впервые использовали альгологическую чистую культуру *Tisochrysis lutea* (Haptophyta) клон MBRU\_Tiso-08 из коллекции “Морской биобанк” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>) (Степанова, Стельмах, 2017).

После заражения жидких культур микроводорослей в малых объемах (в бактериологических пробирках) наблюдения осуществляли в течение 20 сут. Известно, что, если в пробе присутствует искомым альговирус, изменения проявляются уже через 5–10 сут: интенсивность окраски культуры снижается до полного исчезновения цвета, а прозрачность повышается (Степанова, 2014). Затем выполняли несколько пассажей для установления стойкого инкубационного периода и накопления вирусной суспензии (в пробирках). Для получения большого объема вирусных суспензий (0.5–1.0 л) инфицирование жидких культур микроводорослей проводят в пропорции приблизительно 1 : 10, например, 30–50 мл вирусной суспензии на 0.3–0.5 л культуры. При этом лизис наступает на несколько дней позже, чем при использовании пробирок.

В 2002–2019 гг. из проб полевого и клинического материала изолированы новые для науки альговирусы морских микроводорослей *T. viridis* (TvV), *D. viridis* (DvV), *P. tricornerutum* (PtV), *P. pusillum* (PpV), *I. galbana* (IgV) и *T. lutea* (TlV), а также новые для экосистемы Чёрного моря штаммы альговируса микроводоросли *E. huxleyi* (EhV) и

цианофага к культуре цианобактерии *Synechococcus* sp. (ScV). Всего из 1054 изученных проб полевого и клинического материала выделено 325 штаммов альгивирусов, среди которых 80 – TvV, 136 – PtV, 41 – DvV, 20 – PpV, 21 – IgV, 18 – EhV, 3 – ScV и 6 – TIV. Каждая из клинических проб объединяла биологический материал от 2–5 человек; всего материал был взят у 182 пациентов, обработана 41 проба. Из клинических проб выделены 16 вариантов PtV (Stepanova et al., 2011).

Следует отметить, что наиболее успешным (“выгодным”) объектом для изоляции альгивирусов стали мидии, поскольку около 50% всех изученных проб из мантийной жидкости этих моллюсков были контаминированы альгивирусами (Stepanova, 2004, 2016, 2017a, 2018б). Однако мидии как организмы-фильтраторы могут сохранять и накапливать вирусы в течение длительного периода времени, что не позволяет использовать их для мониторинга альгивирусов. Результаты мониторинга при каждом отборе проб должны отражать текущую ситуацию в исследуемой акватории гидроэкосистемы, в нашем случае – наличие (циркуляцию) альгивирусов тех или иных микроводорослей или их отсутствие (численность ниже порога чувствительности используемых методов) в период отбора проб. Кроме этого, в зимнее время отбор мидий связан с определенными трудностями.

Наиболее удобным материалом для исследования альгивирусов служат пробы морской воды, так как их отбор не представляет сложности в любой сезон года, они не требуют предварительной обработки и в 13–66% всех изученных проб морской воды (в зависимости от принадлежности вируса к тому или иному виду микроводоросли-хозяина) обнаруживаются альгивирусы (Stepanova, 2018б).

Запатентованный авторами простой доступный и легко воспроизводимый метод изоляции черноморских альгивирусов может быть рекомендован для использования в любых лабораториях, в том числе и слабо оснащенных. Метод является основой для титрования альгивирусов; он позволяет определять концентрацию (инфекционный титр, численность) вирусов в вирусных суспензиях и в изучаемых пробах, например, для установления сезонной численности альгивирусов в микропланктоне морской воды исследуемых акваторий. Этот метод был использован для изучения хозяев черноморских альгивирусов (Stepanova, 2016), для определения вида изолята неизвестной микроводоросли в чистой культуре (Stepanova, Галатонина, 2009), для выявления влияния на титры альгивирусов ДНК и продуктов ее распада, попадающих в окружающую среду в результате вирусного лизиса (Stepanova, 2005), а также в модельных экспериментах при изучении роли вирусного лизиса в изменении физических характеристик среды обитания альгивирусов (Stepanova, Гайский, 2018; Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019).

Метод использовали также для мониторинга черноморских альгивирусов в экосистеме Крымского региона Чёрного моря. В первую очередь его применяли для изучения распространения, распределения и сезонности альгивирусов, отражающих экологические характеристики микроводорослей-хозяев, а также как часть экомониторинга акваторий в окрестностях г. Севастополь с учетом чувствительности микроводорослей-хозяев альгивирусов к экологической ситуации (Stepanova, 2016, 2018б, 2018в). На основании результатов поиска и изоляции альгивирусов как биологических индикаторов микроводорослей-хозяев предложено применять подобные исследования для изучения географического распространения микроводорослей, а результаты мониторинга альгивирусов в бухтах г. Севастополь подтвердили возможность использования альгивирусов в качестве экологического индикатора (Stepanova, 2007, 2017б, 2018б, 2018в). Анализ результатов изоляции альгивирусов из жабр рыб показал, что вирусная контаминация изучаемого материала наблюдается лишь в холодный сезон года при сокращении продолжительности светового дня. Авторы связывают этот факт со снижением иммунологического статуса организма гидробионтов и рекомендуют использовать тест на наличие альгивирусов в жабрах рыб при изучении состояния популяций представителей ихтиофауны (Stepanova, 2007).

#### *Предварительное изучение черноморских альгивирусов*

Использование простого и доступного авторского метода изоляции альгивирусов из проб морской воды позволило получить представление о сезонности (частоте изоляции альгивирусов в разные сезоны) и определить титр (концентрацию, численность) вирусов в пробе воды и в вирусной суспензии (после установления стойкого инкубационного периода) (Stepanova, 2016). Так, в воде титр альгивирусов микроводорослей *T. viridis* и *D. viridis* при сезонном пике численности их хозяев достигал  $10^5$ – $10^6$  инфекционных единиц в 1 мл, а в вирусных суспензиях был выше на 5–7 порядков. Титры альгивирусов других микроводорослей как в пробах воды, так и в вирусных суспензиях были на несколько порядков ниже. Таким образом, титры альгивирусов в пробах морской воды и в вирусных суспензиях зависят от сезона, сезонного пика и вида хозяина. Очевидна также зависимость титров альгивирусов от экологического статуса изучаемых акваторий, к которому чувствительны микроводоросли – хозяева альгивирусов; частоту изоляции альгивирусов могут определять и неустановленные биотические и абиотические факторы, влияющие как на хозяев, так и на вирусы (Stepanova, 2018a).

В практике вирусологи используют такие простые и доступные классические методики, опи-

санные в пособиях по общей вирусологии, как определение приблизительных размеров изучаемых вирусов на основе фильтрования вирусных суспензий через фильтры с известным размером пор; выявление температурной чувствительности вирусов — определение температуры их инактивации и устойчивости к замораживанию и/или нагреванию. Устойчивость вирусов к температурному фактору косвенно подтверждает их простое строение, а неустойчивость может свидетельствовать о сложном строении вирусов, например, о наличии суперкапсида, который выявляется по чувствительности к хлороформу.

Применение этих простых методик при изучении черноморских альговирусов (Степанова, 2004, 2016; Степанова, Стельмах, 2017) позволило получить данные по биологии и экологии новых для науки альговирусов, а также двух новых для экосистемы Черного моря вирусов EhV и ScV. Исследования вируса ScV еще не завершены и будут продолжены.

С помощью оптического микроскопа получены данные о динамике контакта альговирусов и их хозяев-микроводорослей. В ходе изучения черноморских альговирусов и вирусного лизиса показано, что после 4 ч контакта альговирусов и микроводоросли *T. viridis* подвижность клеток микроводоросли снижалась, а после 8 ч контакта появлялись деформированные (разбухшие) клетки, оболочки которых затем разрывались, а содержимое изливалось в окружающую среду (Степанова, 2004).

Таким образом, предварительное изучение изолированных вирусов, доступное даже для малооснащенных лабораторий, позволяет получить информацию о биологии и экологии выделяемых вирусов, которая может быть полезна для мониторинга (определения сезонности), титрования и уточнения инкубационного периода альговирусов.

*Классические вирусологические методы,  
использованные при изучении черноморских  
альговирусов*

Для более детального изучения черноморских альговирусов применяли электронную микроскопию и такие биохимические методы, как электрофорез вирусных белков, определение принадлежности нуклеиновой кислоты, секвенирование вирусных геномов и их анализ с помощью компьютерных программ. Использовали также приборы, предназначенные для общебиологических исследований, например, микрокалориметр или монитор тепловой (биологической) активности (МБА) (Thermal Activity Monitor LKB 2277, Швеция) и ультрачувствительный флуориметр ToxY-РАМ (Walz, Германия). Принципы и особенности применения этих приборов при исследовании черноморских альговирусов подробно изложены ранее (Степанова, 2004; Stepanova,

2014). Для изучения черноморских альговирусов применяли имеющуюся приборную базу Ин-БЮМ (эпифлуоресцентный и оптический микроскопы, МБА), но чаще использовали приборы, методы и компьютерные программы, принадлежащие материально-техническим базам других научных и практических подразделений России, Украины, Норвегии и США.

Биохимические исследования позволили установить принадлежность нуклеиновых кислот (НК) разных штаммов альговирусов микроводоросли *T. viridis*, провести анализ их белкового спектра, определить размер геномов, а также выполнить исследования по секвенированию геномов черноморских альговирусов (Степанова, 2004; Степанова и др., 2005, 2013). По результатам исследования при помощи электрофореза белкового спектра черноморских альговирусов микроводоросли *T. viridis* обнаружено около 40 вирусных белков черноморских альговирусов этой микроводоросли. Использование комплекта реагентов “РИБО-сорб” для выделения РНК/ДНК позволило подтвердить принадлежность к ДНК вирусных НК, выделенных из концентрированных вирусных суспензий. Исследования проводили на базе Главного военного клинического госпиталя (Украина, Киев). Размер геномов альговирусов штаммов TvV-S20, TvV-S11 и DvV-S12 определяли в электрофорезе, используя в качестве маркера НК TvV-S1, принадлежность которой к ДНК и размер (20–23 kbp) были определены в Бергенском университете (Норвегия).

В соответствии с программой международного проекта “Marine Phage, Virus & Virome Sequencing Project” (Broad Institute, MIT, USA) геномы трех штаммов черноморских альговирусов были секвенированы, ассемблированы и аннотированы исследователями Broad Institute (см.: Henn et al., 2010); полученные результаты представлены в базы данных CAMERA и NCBI. Предварительный анализ геномов штаммов TvV-S20, TvV-S11 и DvV-S12 черноморских альговирусов, проведенный с помощью компьютерной программы (Shcherbatenko, 2012), выявил их сходство с наиболее изученными вирусами микроводорослей семейства Phycodnaviridae, обнаружив при этом уникальность и индивидуальные особенности исследованных штаммов, основанные на космополитной комбинации их генов (Степанова и др., 2013).

По результатам электрофореза выявлено около 40 вирусных белков альговируса микроводоросли *T. viridis*, а по данным CAMERA — 55; при анализе с помощью компьютерной программы выявлено свыше 80 белков. Таким образом, анализ генетических данных оказался наиболее эффективным методом при обнаружении вирусных белков.

Электронно-микроскопические и биохимические исследования, в том числе секвенирование вирусных геномов и их анализ, позволили пополнить знания о биологии альговирусов и стали до-

полнительным аргументом для включения обнаруженных в Чёрном море альговирюсов в семейство Phycodnaviridae.

### Модельные эксперименты

В результате поиска, изоляции, изучения и мониторинга морских вирусюсов создана коллекция черноморских альговирюсов, которая в настоящее время поддерживается на базе ИПТС. Коллекция черноморских альговирюсов используется для выполнения модельных экспериментов и/или исследований.

Модельные эксперименты с применением прибора МБА показали, что контакт альговирюсов и раствора ДНК сопровождался повышением теплопродукции с кооперативным переходом, а под влиянием тетрапуклеотидов гуанин-цитозин-гуанин-цитозин происходило угнетение инфекционного титра некоторых штаммов альговирюсов (Степанова, 2004; Stepanova et al., 2003; Stepanova, 2005, 2014). Мы полагаем, что в природе это явление может играть роль регулятора активной вирусной инфекции, плавно останавливая процесс гибели хозяев-микроорганизмов и сохраняя их как вид, что не противоречит, а дополняет существующую концептуальную модель вирусного контроля разнообразия сообществ хозяев (Wommack, Colwell, 2000).

В модельных экспериментах установлено, что мидия *M. galloprovincialis* может утилизировать (усваивать и накапливать в тканях и органах) до 99% альговирюсов из воды (Степанова, 2017а). Выявлена зависимость этого показателя от продолжительности опыта, сложности морфологии вируса, возраста (размера) моллюска и наличия неиндикаторной для вируса микроводоросли; ее присутствие приближает эксперимент к природным условиям, способствует удержанию вирусюсов в псевдофекалиях и ускоряет их утилизацию мидиями. Установлено, что часть альговирюсов концентрируется в организме фильтрующих моллюсков и возвращается в окружающую среду с фекалиями, поступая на дно, где может быть использована бентофагами, и/или диффундирует обратно в пелагиаль. Полученные результаты свидетельствуют об участии двустворчатых моллюсков в циркуляции морских вирусюсов.

Экспериментальное изучение контакта культуры морской микроводоросли *T. viridis* с альговирюсом (штамм TsV-S1) показало, что в условиях непрерывного искусственного освещения вирусное инфицирование клеток водорослей при интенсивности света 60 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) отмечалось через сутки после заражения культуры, а при 20 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) – через двое суток (Степанова, 2019). Инфицированные и неинфицированные клетки различались по форме и размерам. При интенсивности света 60 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) инфицированная культура начинала отмирать в конце третьих су-

ток при численности клеток  $3 \times 10^5$  кл./мл, а при освещении 20 мкЭ/(м<sup>2</sup> с) – в начале пятых суток при такой же численности. В условиях низкой интенсивности света полный лизис водорослей происходил к концу шестых суток; при увеличении интенсивности света в 3 раза этот процесс сокращался до четырех суток. Ранее контакт культуры морской микроводоросли *T. viridis* с альговирюсом (штамм TsV-S1) в условиях комнатной температуры и освещенности изучали в оптическом микроскопе, а также по уровню теплопродукции с использованием метода микрокалориметрии (Степанова, 2004; Stepanova, 2006, 2014). Использование метода микрокалориметрии в сочетании с другими методами расширило знания о динамике контакта микроводорослей и альговирюсов, а также позволило получить объективные результаты, подкрепленные цифровыми данными и графическими изображениями. Установлено, что через 4 ч теплопродукция инфицированной культуры микроводоросли незначительно отличалась от таковой в контроле (без вируса). Через 8–10 ч после заражения теплопродукция инфицированной культуры была уже в 3 раза ниже, чем в контроле, но визуальные различия между опытом и контролем через 10 ч отсутствовали. Однако использование оптического микроскопии позволило увидеть, что уже через 4 ч подвижность инфицированных клеток значительно сокращалась по сравнению с таковой клеток в контрольном образце культуры. Различия между контролем и опытом, видимые невооруженным глазом, обычно наблюдались через 20–24 ч: в опыте был виден осадок, надосадочная жидкость была прозрачной; в контроле культура сохраняла зеленый цвет, наиболее интенсивный у поверхности. На этом этапе теплопродукция контрольного образца была в 3.5 раза выше, чем опытного. Спустя несколько суток осадок в опыте терял цвет, а в контроле интенсивность окраски практически не изменялась; теплопродукция в опыте снижалась до 0.5 мкВт. Это можно объяснить тепловыделением при росте и развитии бактериальной флоры, так как в экспериментах используются альгологически чистые культуры, в которых не исключено присутствие бактерий. Теплопродукция контрольной культуры достигала 11 мкВт, что свидетельствовало о продолжающемся росте и развитии микроводорослей. Инфицирование основной массы клеток, вероятно, происходило в течение первых четырех часов контакта микроводоросли *T. viridis* с альговирюсом TvV-S1 и сопровождалось снижением двигательной активности клеток. Это отражалось на уровне теплопродукции инфицированной культуры. Разница между количеством выделяемого тепла в контроле и в опыте через 8 ч после начала эксперимента указывает на угнетение метаболизма у инфицированной культуры. На этом этапе в опытных образцах наблюдали разрыв клеточных оболочек и разрушение отдельных клеток микроводоросли.

В контроле клетки водоросли были активными, нарушений их целостности не отмечено. Через 24 ч в надосадочной жидкости инфицированной культуры клетки микроводорослей отсутствовали, а в осадке присутствовали неподвижные часто деформированные клетки, оболочки которых разрушались. Очевидно, при разрыве (лизисе) клеток происходит выход созревших вирионов во внешнюю среду. К этому времени разница между уровнями теплопродукции в опыте и контроле была самой большой.

Особый интерес представляют исследования по влиянию вирусов гидросферы и вирусного лизиса на физические параметры водной среды, в которой они обитают. Результаты модельных экспериментов по изучению черноморских альговирусов позволяют утверждать, что морские вирусы и их вирусный лизис необходимо учитывать как в теории, так и в практике физики моря, в том числе в оптике. Для проведения модельных экспериментов по изучению влияния вирусного лизиса на электрическую проводимость (ЭП) и прозрачность морской воды были созданы лабораторная установка и экспериментальный лабораторный стенд, которые были подробно описаны ранее (Степанова, Гайский, 2018; Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019; Шоларь и др., 2019). В настоящее время создана и находится на стадии модернизации двухъярусная лабораторная установка, использование которой позволит одновременно получать результаты по динамике изменения ЭП и прозрачности морской воды как в опыте (контакт культуры микроводоросли с альговирусом), так и в контроле (рост и развитие культуры микроводоросли без вирусного лизиса).

Известно, что простейшие одноклеточные организмы могут влиять на состояние и величину электрической энергии в гидросфере. В водной среде микроорганизмы в процессе жизнедеятельности изменяют окислительно-восстановительный потенциал, концентрацию водородных ионов и метаболитов, а также генерируют электрические поля. Показано, что локальная неоднородность электрического поля акватории помимо гидродинамических и химических факторов может определяться также жизнедеятельностью бактерио-, фито- и зоопланктона. На изменение электрического потенциала водной среды в результате жизнедеятельности гидробионтов влияют их генотип, функциональное состояние и адаптационный фактор (Александров, 1985). Естественно, что функциональное состояние одноклеточных гидробионтов изменяется при их контакте с вирусами, что позволяет говорить о влиянии вирусного лизиса на электрический потенциал водной среды их обитания, в том числе на изменение ЭП воды. Клетки микроводоросли-хозяина оказывают определенное влияние на ЭП среды, а вирусы, разрушая клетки микроводоросли, приводят к снижению ЭП. Вероятно, этим можно объяснить снижение ЭП морской воды в процессе контакта

микроводоросли и альговирусов на фоне повышения температуры воды, которое мы наблюдали в экспериментах (Степанова, Гайский, 2018; Степанова и др., 2018), хотя это противоречит принятой физической зависимости. Снижение ЭП жидкости (смеси на основе морской воды) отмечено в период лизиса клеток культур микроводорослей соответствующими альговирусами. Микромоделю пика численности фитопланктона с последующим вирусным лизисом, созданная в культуре, соответствует микромоделю сезонного вирусного пика в природе. Таким образом, экспериментально полученные результаты снижения ЭП морской воды при вирусном лизисе позволяют предположить, что в сезонные пики численности фитопланктона, за которыми следуют пики численности альговирусов, в акваториях должно наблюдаться изменение ЭП. Каким будет характер этого изменения — местным, локальным или повсеместным, т.е. глобальным, еще предстоит изучить. Мы не обнаружили литературных данных о динамике ЭП морской воды, связанной с сезонными пиками численности морских микроорганизмов (бактерио-, фито-, вириопланктона). В то же время результаты проведенных нами экспериментов с учетом требований по точности, предъявляемых к действующему международному уравнению состояния морской воды TEOS-10 (см.: IOC, SCOR and IAPSO, 2010), позволяют утверждать, что это влияние существенно.

В лабораторных условиях с использованием микробиоты в основном тихоокеанских регионов изучены и описаны оптические параметры жидкой среды в процессе вирусного лизиса (Balch et al., 2002; Simis et al., 2005, 2007; Uitz et al., 2010). Исследования нацелены на изучение процесса вирусного лизиса с учетом многих меняющихся показателей, таких как численность клеток; количество пигментов; размеры органических частиц, образующихся в результате вирусного лизиса; степень их агрегации; химический состав среды и т.д. Характерные изменения, обнаруженные в ходе вирусного лизиса в условиях эксперимента, предложено использовать для индикации вирусного лизиса в гидросфере и для выявления массовой смертности одноклеточных хозяев в водоемах на основе оптического дистанционного зондирования. Однако значение вирусов и вирусного лизиса в изменении физических характеристик водной среды их обитания не рассматривалось, а вирусы не учитывались в качестве активных компонентов физики и оптики гидросферы. Сведения (в том числе экспериментальные) о роли черноморских вирусов (альговирусов) в изменении прозрачности акватории Чёрного моря до недавнего времени также отсутствовали. Для определения роли черноморских альговирусов и вирусного лизиса в изменении прозрачности среды их обитания был выполнен ряд модельных экспериментов с использованием черноморской микробиоты — культур микроводорослей и суспензий

альговирюсов (Степанова и др., 2018; Шоларь, Степанова, 2019; Шоларь и др., 2019). Изменение прозрачности морской воды в экспериментах фиксировали при помощи малогабаритного мультиспектрального измерителя показателя ослабления направленного света (ПОС) – СИПО (Латушкин, 2013) с применением двухъемкостного экспериментального лабораторного стенда, где в одном из опытов использовали культуру микроводоросли *D. viridis* в контакте с вирусной суспензией альговирюса DvV-S11, а в контроле – только культуру микроводоросли *D. viridis* без вирусa. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии вирусного лизиса на прозрачность морской воды и частично объясняют аномалии оптических свойств воды, наблюдаемые в разных океанических регионах, что является оригинальным дополнением к уже существующим предположениям и объяснениям (Organelli et al., 2017). Предположение о связи вирусного лизиса с аномалиями оптических свойств морской воды, например, с быстрым изменением прозрачности в динамике пика цветения фитопланктона, указывает на необходимость учета в теории и практике физики и оптики моря пока еще мало изученного вклада морских (водных) вирусюв.

Таким образом, анализ опубликованных данных по поиску, изоляции и изучению черноморских альговирюсов показал, что в ходе исследований помимо классических методов могут успешно применяться методики, усовершенствованные и/или разработанные авторами обзора. Использование этих методик позволило изолировать и изучить новые для науки и для экосистемы Чёрного моря вирусю микроводорослей и одного вида цианобактерий.

Клинический материал и материал, полученный от гидробионтов, стали новыми источниками для изоляции альговирюсов, что позволило заметно расширить знания по экологии морских вирусюв. Новые для науки данные получены в результате модельных экспериментов; разработаны уникальная лабораторная установка и экспериментальный стенд для исследования вирусного лизиса.

На основании результатов поиска и изоляции альговирюсов из проб морской воды, отобранной в бухтах у г. Севастополь, мониторинг альговирюсов предложено использовать в качестве экологического индикатора и как составляющую экомониторинга, а альговирюсы рассматривать как биологические индикаторы и/или маркёры.

В результате проведенного экспериментального изучения вирусного лизиса одноклеточных микроводорослей-хозяев с использованием созданных лабораторных установки и стенда выявлены новые для физики и оптики моря факты на уровне биофизических процессов контакта вирусю и хозяина. Полученные данные позволяют обосновать и упрочить представления о морских (вод-

ных) вирусюв и вирусном лизисе как об активных физических и оптических компонентах (элементах) в гидросфере, которые необходимо учитывать в теории и практике физики моря.

Краткое описание методологии поиска, изоляции и изучения черноморских альговирюсов, в том числе модельных экспериментов, и полученных результатов может послужить стимулом для активизации морской (водной) вирусологии в научных учреждениях как нашей страны, так и за рубежом, где это новое научное направление еще не получило должного развития.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2019-0003 “Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод” и по теме № 0827-2019-0002 МГИ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александров В.В. Электрофизика пресных вод. Л.: Гидрометеиздат. 1985. 184 с.
- Декларационный патент на изобретение 65864А UA, MKU 7 C12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів однокілтінних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita) / Степанова О.А. (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № 2003065499; заявл. 13.06.2003; опубл. 15.04.2004 // Промислова власність. Офіційн. бюл. 2004. № 4.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Изучение морфологического разнообразия бактериофагов озера Байкал // Докл. Акад. наук. 2006. Т. 410. № 6. С. 847–849.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В. Бактериофаги как новое трофическое звено в экосистеме глубоководного озера Байкал // Докл. Акад. наук. 2009. Т. 427. № 2. С. 277–281.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В., Ковадло А.С. и др. Вирусологический и бактериологический мониторинг экосистемы олиготрофного озера Байкал // Проблемы устойчивого функционирования водных и наземных экосистем: Материалы междунаро. науч. конф. (Ростов-на-Дону, 9–12 октября 2006 г.). Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ. 2006. С. 118–121.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В., Ковадло А.С., Косторнова Т.Я. Размерная структура, сезонная динамика и вертикальное распределение бактериофагов озера Байкал // Изв. ИрГУ. Науки о Земле. 2008. Т. 1. № 1. С. 189–197.
- Дрюккер В.В., Дутова Н.В., Ковадло А.С. Вириопланктон и бактериопланктон высокогорного озера Хуб-



- сугул (Монголия) // Докл. Акад. наук. 2011. Т. 440. № 2. С. 282–285.
- Дутова Н.В., Дрюккер В.В. Морфологические и размерные характеристики вирусов озера Байкал // Гидробиол. журн. 2009. Т. 45. № 4. С. 82–89.
- Дутова Н.В., Дрюккер В.В. Вирусное сообщество биопленок, формирующихся на различных субстратах в природных условиях озера Байкал // Докл. Акад. наук. 2013. Т. 450. № 4. С. 468–470.
- Копылов А.И. Роль вирусов в структуре и функционировании микробных сообществ в пресноводных экосистемах // Журн. Сиб. фед. ун-та. Биология. 2013. Т. 6. № 4. С. 354–367.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Вирусы в планктоне Рыбинского водохранилища // Микробиология. 2007. Т. 76. № 6. С. 879–887.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Распределение вирусов и их влияние на бактериопланктон в эвтрофном и мезотрофном водохранилищах // Биол. внутренних вод. 2008. № 1. С. 49–57.
- 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.
- Копылов А.И., Косолапов Д.Б., Заботкина Е.А. Влияние вирусов на гетеротрофный бактериопланктон водохранилищ // Микробиология. 2011. Т. 80. № 2. С. 241–250.
- Латушкин А.А. Многоканальный измеритель коэффициента ослабления света для проведения океанографических подспутниковых исследований // Современные технологии проектирования управляющих и мехатронных систем: Материалы международ. науч. конф. (Севастополь, 16–19 апреля 2013 г.). Севастополь: Изд-во СевНТУ. 2013. С. 231–236.
- Лихошвай Е.В. В каждой капле воды – вирусы // Наука из первых рук. 2016. Т. 70. № 4. С. 88–94.
- Патент 97293 С2 UA, МПК С12N 1/12. Спосіб ізольованні альговірусів мікроводорості *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyta) з проб морської води / Степанова О.А. (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № а 2010 03881; заявл. 06.04.2010; опубл. 25.01.2012 // Промислова власність. Офіційн. бюл. 2012. № 2. С. 3–91.
- Стельмах Л.В., Степанова О.А. Влияние вирусной инфекции на развитие зеленой водоросли *Tetraselmis viridis* в культуре // Системы контроля окруж. среды. 2019. № 2 (36). С. 93–99.
- Степанова О.А. Морские бактерии и вирусы в воде и донных осадках бухт Севастополя // Экология. 2001. № 1. С. 61–63.
- Степанова О.А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря. Севастополь: Мир. 2004. 308 с.
- Степанова О.А. Некоторые сведения о вириопланктоне и его отдельных представителях // Успехи соврем. биол. 2005. Т. 125. № 6. С. 543–555.
- Степанова О.А. Сезонность контаминации рыб альговиррусами (Черное море) // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Материалы международ. науч.-практ. конф. (Борк, 17–20 июля 2007 г.). М.: Россельхозакадемия. 2007. С. 273–277.
- Степанова О.А. Черноморские альговиррусы // Биол. моря. 2016. Т. 42. № 2. С. 99–103.
- Степанова О.А. Взаимодействие альговиррусов и мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) в условиях эксперимента // Биол. моря. 2017а. Т. 43. № 2. С. 97–101.
- Степанова О.А. Результаты поиска альговиррусов – отражение географического распространения микроводорослей // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017: Сб. ст. по материалам научно-практ. конф. с международ. участием (Севастополь, 11–15 сент. 2017 г.). Севастополь: Изд. СевГУ. 2017б. С. 1284–1288.
- Степанова О.А. Ответные реакции вирусов гидросферы и их одноклеточных хозяев на экологические факторы // Системы контроля окруж. среды. 2018а. № 12 (32). С. 99–108.
- Степанова О.А. Результаты мониторинга черноморских альговиррусов в бухтах Севастополя и Крыма (2002–2018 гг.) // Системы контроля окруж. среды. 2018б. № 14 (34). С. 122–127.
- Степанова О.А. Мониторинг альговиррусов индикаторных к экологической ситуации микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum* в бухтах Севастополя (2002–2018 гг.) // Уч. зап. Крымского фед. ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2018в. Т. 4 (70). № 3. С. 174–181.
- Степанова О.А., Бойко А.Л., Гордиенко А.И. и др. Характеристика вируса *Tetraselmis viridis* Norris (Chlorophyta, Prasinophyceae) // Докл. НАН Украины. 2005. № 1. С. 158–162.
- Степанова О.А., Бойко А.Л., Щербатенко И.С. Компьютерный анализ геномов трех морских альговиррусов // Микробиол. журн. 2013. Т. 75. № 5. С. 76–81.
- Степанова О.А., Гайский П.В. Динамика изменений электрической проводимости морской воды под влиянием биотической составляющей в условиях эксперимента // Системы контроля окруж. среды. 2018. № 11 (31). С. 48–56.
- Степанова О.А., Гайский П.В., Шоларь С.А. Влияние вирусного лизиса на некоторые физические параметры морской воды в условиях эксперимента // Системы контроля окруж. среды. 2018. № 13 (33). С. 19–28.
- Степанова О.А., Галатонова О.А. Определение вида микроводоросли с использованием альговирруса // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: Материалы II всерос. конф. (Сыктывкар, 5–9 октября 2009 г.). Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН. 2009. С. 33–34.
- Степанова О.А., Климчук Д.А., Новиченко В.Н. Первая изоляция альговирруса *Dunaliella viridis* Teod. (Chlorophyta) из черноморской среды // Докл. НАН Украины. 2009. № 11. С. 165–168.
- Степанова О.А., Кузьминова Н.С. Контаминация морских рыб альговиррусами // Рыб. хоз-во Украины. 2006. № 1. С. 26–27.
- Степанова О.А., Стельмах Л.В. Поиск и изоляция нового альговирруса микроводоросли *Tisochrysis lutea* из экосистемы Черного моря в бухтах Севастополя (Крымский регион) // Экосистемы. 2017. № 12 (42). С. 28–34.
- Шоларь С.А., Степанова О.А. Изоляция альговиррусов из черноморской среды у побережья Севастополя (2002–2010 гг.) // Биол. внутренних вод: Материалы XIV школы-конференции молодых ученых

- (Борок, 26–30 октября 2010 г.). Ярославль: Принт-хаус. 2010. С. 183–190.
- Шоларь С.А., Степанова О.А. Результаты изменения оптических свойств морской среды в эксперименте при моделировании микропроцесса – вирусно-лизиса при контакте микроводорослей и альго-вирусов // Информ. системы и технологии – 2019. Сб. материалов XXV Международ. науч.-техн. конф. (Нижегород, 19 апреля 2019 г.). Н. Новгород: Изд. НГТУ им. П.Е. Алексеева. 2019. С. 901–907.
- Шоларь С.А., Степанова О.А., Стельмах Л.В. Использование экспериментального лабораторного стенда для изучения оптических свойств водной среды в присутствии микробиоты // Системы контроля окруж. среды. 2019. № 2 (36). С. 13–21.
- Balch W.M., Vaughn M. Jr., Novotny J.F. et al. Fundamental changes in light scattering associated with infection of marine bacteria by bacteriophage // *Limnol. Oceanogr.* 2002. № 47. P. 1554–1561.
- Coy S.R., Gann E.R., Pound H.L. et al. Viruses of eukaryotic algae: diversity, methods for detection, and future directions // *Viruses*. 2018. V. 9. № 10. P. 487–514.
- Henn M.R., Sullivan M.B., Stange-Thomann N. et al. Analysis of high-throughput sequencing and annotation strategies for phage genome // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2. P. 9083–9095.
- IOC, SCOR and IAPSO, 2010: The international thermodynamic equation of seawater – 2010: Calculation and use of thermodynamic properties. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manuals and Guides. № 56. UNESCO. 196 p.
- Manual of aquatic viral ecology. *Limnology and Oceanography e-Books*. American Society of Limnology and Oceanography. 2010. Ch. 1–19. 201 p.
- Middelboe M., Brussaard C. Marine viruses: key players in marine ecosystems // *Viruses*. 2017. V. 9. № 10. P. 302–308.
- Organelli E., Claustre H., Bricaud A. et al. Bio-optical anomalies in the world's oceans: an investigation on the diffuse attenuation coefficients for downward irradiance derived from Biogeochemical Argo float measurements // *J. Geophys. Res.: Oceans*. 2017. V. 122. № 5. P. 3543–3564.
- Pagarete A., Grébert T., Stepanova O. et al. Tsv-N1: A novel DNA algal virus that infects *Tetraselmis striata* // *Viruses*. 2015. V. 7. P. 3937–3953.
- Proposal for SCOR WG to investigate the role of viruses in marine ecosystems // *Proc. Sci. Comm. Oceanic Res.* (Venice, Italy, Sept. 2004). Baltimore, USA. 2005. V. 40. P. 66–70. (Annex 4).
- Shcherbatenko I.S. Graphical visualization of the biologically significant segments in the sequence sets of the relative plant viruses // *Mikrobiol. Zh.* 2012. V. 74. № 5. P. 108–115.
- Simis S.G.H., Tijdens M., Hoogveld H.L. et al. Optical changes associated with cyanobacterial bloom termination by viral lysis // *J. Plankton Res.* 2005. V. 27. № 9. P. 937–949.
- Simis S.G.H., Tijdens M., Hoogveld H.L. et al. Optical signatures of the filamentous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* during mass viral lysis // *Limnol. Oceanogr.* 2007. № 52. P. 184–197.
- Stepanova O.A. Influence of a tetranucleotide, CGCG, on marine algal viruses // *Ukr. Bioorg. Acta.* 2005. V. 2. № 1. P. 25–27.
- Stepanova O.A. Heat production of marine algae viruses contact with microseaweed // XIV Conf. ISBC. Sopot, Poland. 2–6 June 2006. P. 59–60.
- Stepanova O. Search, isolation and study of Black sea algal viruses 2002–2013. New facts and hypotheses. Saarbrücken: Lambert Acad. Publ. 2014. 56 p.
- Stepanova O.A., Shaida V.G., Boyko A.L. Study of heat production of interaction between DNA and viruses in vitro // A year after Johannesburg – Ocean governance and sustainable development: Ocean and coasts – A glimpse into the future (Kiev, 27–30 Oct. 2003). Kiev. 2003. P. 125–126.
- Stepanova O.A., Solovyova Y.A., Solovyov A.V. Results of algae viruses search in human clinical material // *Ukr. Bioorg. Acta.* 2011. № 2. P. 53–56.
- Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. № 5. P. 801–812.
- Uitz J., Stramski D., Baudoux A.C. et al. Variations in the optical properties of a particle suspension associated with viral infection of marine bacteria // *Limnol. Oceanogr.* 2010. № 55. P. 2317–2330.
- Viruses of microorganisms. Caister Academic Press. 2018. 374 p.
- Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. V. 64. № 1. P. 69–114.
- Yolken R.H., Jones-Brando L., Dunigan D.D. et al. Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 45. P. 16106–16111.

## Materials, Methods and Experiments in the Study of the Black Sea Algal Viruses

O. A. Stepanova<sup>a</sup>, P. V. Gaisky<sup>a</sup>, and S. A. Sholar<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Institute of Natural and Technical Systems, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

<sup>b</sup>Marine Hydrophysical Institute, Russian Academy of Sciences, Sevastopol 299011, Russia

The major studies of the Black Sea algal viruses in Russia have been conducted at scientific institutes located in Sevastopol. A review of the methodological approaches used during the period of 2002–2019 shows that both classical virological methods and methods that were recently developed and patented (among them those by the authors) are applicable to the search, isolation, and study of algal viruses. The study of samples of clinical material and material of aquatic organisms, as well as model experiments, including those using a unique laboratory installation and a test stand, revealed new data on the biology and ecology of marine viruses. Based on the results from these studies, it was proposed to use algae viruses monitoring as a component in aquatic environment monitoring, in which algal viruses are considered as biological indicators and/or markers.

**Keywords:** algal viruses, microalgae, viral lysis, Black Sea, laboratory installation, test stand