

ФИТОПЛАНКТОН, ФИТОБЕНТОС,  
ФИТОПЕРИФИТОН

УДК 581.526.325578.4(262.5)

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ  
И ЛИЗИС ЧЕРНОМОРСКИХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *Tetraselmis viridis*  
(Chlorophyta) И *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyta)

© 2020 г. Л. В. Стельмах<sup>а</sup>, \*, О. А. Степанова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН”,  
Севастополь, Россия

<sup>б</sup>Институт природно-технических систем, Севастополь, Россия

\*e-mail: lustelm@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

После доработки 22.07.2019 г.

Принята к публикации 05.12.2019 г.

Проведены экспериментальные исследования на культурах черноморских микроводорослей *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara (Chlorophyta) и *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin (Bacillariophyta) с использованием штаммов альговирусов этих микроводорослей – TsV-S1 и PtV-S18, выделенных из воды Черного моря. Выявлено влияние интенсивности света и исходной численности клеток микроводорослей на начало их инфицирования вирусами и на отмирание в результате лизиса. Уже на вторые-третьи сутки в зараженных вирусами культурах отмечены клетки, изменившие свою форму и увеличившиеся в объеме. В это же время наблюдалось снижение красной автофлуоресценции хлорофилла *a*, начального уровня переменной флуоресценции в расчете на клетку и фотохимической эффективности фотосистемы 2. Начало снижения численности клеток в исследуемых культурах вследствие вирусного лизиса отмечено на одни-два суток позже. Пороговая численность клеток, при достижении которой наблюдали этот процесс, не зависела от световых условий и достигала  $3 \times 10^5$  кл./мл у *Tetraselmis viridis* и  $18 \times 10^5$  кл./мл у *Phaeodactylum tricornerutum*. Полный лизис клеток водорослей выявлен к концу четвертых–шестых суток. При отсутствии света отмечено незначительное влияние вирусов на микроводоросли.

**Ключевые слова:** морские микроводоросли, альговирусы, фитопланктон, Черное море

**DOI:** 10.31857/S0320965220030171

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусы – одни из важнейших компонентов водных экосистем. В 1 мл морской воды содержится от  $10^5$  до  $10^9$  вирусных частиц (Stepanova, 2017; Suttle, 2007). Большинство из них поражают бактерии, а также макро- и микроводоросли. Основные причины гибели функционально активных клеток морского фитопланктона – их потребление зоопланктоном и лизис, вызванный экзогенной вирусной инфекцией (Beckett, Weitz, 2018; Bidle et al., 2007; Pasulka et al., 2015). Вирусный лизис считается основной причиной ежедневной гибели ~3–5% клеток фитопланктона (Wommack, Colwell, 2000), в отдельные периоды эта величина достигает 25–30% (Evans et al., 2003; Mojica et al., 2016). Довольно быстрое прекращение “цветения воды”, вызываемое отдельными видами микроводорослей, может происходить в

результате высокой численности вирусов в зонах “цветений” и, как следствие этого, вирусного лизиса растительных клеток (Baudoux et al., 2006, 2008; Bratbak et al., 1993, 1996; Cottrell, Suttle, 1995; Lehahn et al., 2014; Suttle, 2007; Vardi et al., 2009). Органическое вещество фитопланктона, попадающее во внешнюю среду в результате вирусного лизиса его представителей, потребляется, главным образом, бактериями. Этот процесс получил название “вирусного шунта” (Pagarete et al., 2015; Wommack, Colwell, 2000).

Для общей оценки доли фитопланктона, погибающего под действием вирусной инфекции, в настоящее время используют модифицированный метод разведения (Evans et al., 2003). Однако он очень трудоемок и пока не нашел широкого применения в гидробиологической практике. Четкая и общепризнанная методология проведения исследований по влиянию вирусов на фитопланктон до настоящего времени не разработана. Одна из возможных причин этого связана с высо-

**Сокращения:** Хл – хлорофилл;  $F_0$ /кл. – начальный уровень переменной флуоресценции в расчете на клетку;  $F_v/F_m$  – фотохимическая эффективность фотосистемы 2.

кой видовой специфичностью вирусов, поражающих узкий круг хозяев. Часто один штамм вируса имеет только одного хозяина — один вид водорослей (Kim et al., 2015), хотя для некоторых черноморских альговирюсов обнаружено по два и более (Stepanova, 2016). На фоне многочисленных публикаций и литературных обзоров о роли влияния условий среды на стимулирование вирусного лизиса фитопланктонных клеток основные причины пока неясны (Hogas et al., 2018; Wommack, Colwell, 2000). Для выявления роли отдельных факторов, таких как свет, температура, биогенные вещества, в регуляции этого процесса логично использовать результаты лабораторных экспериментов контакта вирусов с их хозяевами — микроводорослями. Причем такие результаты впоследствии могут быть экстраполированы на ситуацию с фитопланктоном морских и пресноводных водоемов, а также использоваться при разработке методологии исследований по выявлению роли вирусов в функционировании фитопланктона и его отдельных представителей.

Цель работы — оценить влияние вирусной инфекции на некоторые структурные и функциональные характеристики двух видов черноморских микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricorutum* в условиях их роста в накопительной культуре при разной интенсивности света и в темноте.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были альгологически чистые культуры микроводорослей *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara (Chlorophyta) и *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin (Bacillariophyta), выделенные из планктона Черного моря и содержащиеся в коллекции отдела экологической физиологии водорослей Федерального исследовательского центра “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН”. Средний объем клеток первого вида  $260 \pm 40$  мкм<sup>3</sup>, второго —  $80 \pm 20$  мкм<sup>3</sup>. Эти виды водорослей часто используются в качестве модельных объектов, обладающих высокой жизнеспособностью в процессе культивирования. До начала эксперимента каждую культуру адаптировали в течение двух-трех суток к двум значениям интенсивности непрерывного света: первое (I) — лимитировало рост водорослей, второе (II) — обеспечивало их максимальную скорость роста. Для *Tetraselmis viridis* первое значение было  $20$  мкЭ/(м<sup>2</sup> · с), второе —  $60$  мкЭ/(м<sup>2</sup> · с), для *Phaeodactylum tricorutum* —  $20$  мкЭ/(м<sup>2</sup> · с) и  $100$  мкЭ/(м<sup>2</sup> · с) соответственно. Для третьего варианта опыта культуру *Tetraselmis viridis* адаптировали к темноте в течение 3 сут.

Каждую адаптированную культуру делили на три части (по 50 мл) и помещали в конические колбы объемом 150 мл. В первую (контрольную) колбу вносили 50 мл стерильной морской воды с питательной средой f/2 (Guillard, Ryther, 1962). Во вторую и третью (опытные колбы) добавляли по 50 мл вирусной суспензии при титре  $10^7$  вирионов/мл для альговирюса *Tetraselmis viridis* (штамм TsV-S1) и  $10^6$  вирионов/мл для альговирюса *Phaeodactylum tricorutum* (штамм PtV-S18). Титр (концентрация, численность) альговирюсов в вирусных суспензиях определяли по авторской запатентованной методике (Stepanova, 2016).

Методом электронной микроскопии ранее установлено, что штамм TsV-S1 имеет форму икосаэдра с диаметром 56–60 нм (рис. 1а). Штамм PtV-S18 также представляет собой икосаэдр с диаметром 45–48 нм (рис. 1б). На основании результатов изучения черноморских альговирюсов, в том числе используемых в работе вирусных штаммов, с учетом генетического анализа, они отнесены к сем. Phycodnaviridae (Stepanova, 2016).

Вирусную суспензию до начала экспериментов хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для активации вирусов в размороженную суспензию вносили культуру хозяина (1 : 1 по объему), находившуюся в фазе логарифмического роста, и экспонировали на рассеянном свете при температуре  $18^{\circ}\text{C}$  в течение 10–14 сут. После вирусного лизиса культуры и установления вирусного титра в суспензии проводили ее предварительную очистку путем центрифугирования при 3000 оборотов/мин в течение 10 мин. Затем вирусную суспензию пропускали через трековую мембрану с диаметром пор 0.2 мкм. В результате получали чистые вирусные суспензии двух штаммов TsV-S1 и PtV-S18, которые использовали в экспериментах.

Контрольные и опытные колбы, помещенные на световую решетку, освещали снизу с помощью светодиодов. Освещенность измеряли с помощью люксметра Ю-116, коэффициент перехода от освещенности в люксах к интенсивности света —  $10^4$  лк = 170 мкЭ/(м<sup>2</sup> · с) (Парсонс и др., 1982). В экспериментах использовали оптимальную для развития данных видов водорослей температуру воды  $18^{\circ}\text{C}$ .

Длительность экспериментов при разных интенсивностях света была 4–6 сут. Пробы объемом 5 мл в контроле и опыте отбирали с 9 до 17 ч с интервалом 4–8 ч. В эксперименте с культурой *Tetraselmis viridis*, помещенной в темноту, пробы отбирали в течение 10 сут с интервалом 48–96 ч, что связано с замедлением лизиса клеток водорослей в темноте в результате снижения их физиологической активности, отражающейся на способности продуцировать вирусы.

Для учета численности клеток и их фотографирования в светлом и темном поле использова-

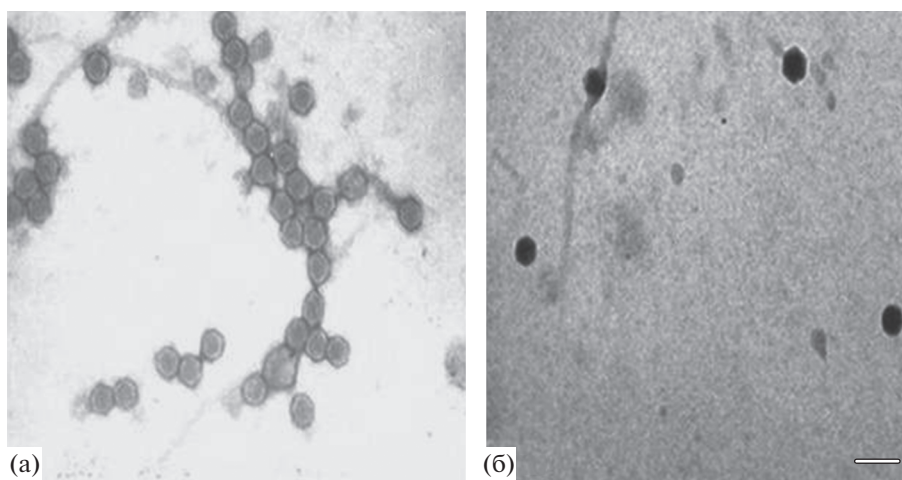


Рис. 1. Электронно-микроскопические фотографии альговирuses микроводорослей *Tetrasetelmis viridis* (а) (штамм TvV-S1) и *Phaeodactylum tricornerutum* (б) (штамм PtV-S18). Масштаб на рис. 1б – 103 нм.

ли световой микроскоп Микромед ЗЛЮМ. Дополнительно микроскоп оснащали флуоресцентным блоком с ртутной лампой мощностью 100 Вт и фотокамерой TourCam UCМOS 14000 КРА. Для возбуждения красной автофлуоресценции Хл *a* использовали синий светофильтр (диапазон возбуждения флуоресценции 410–490 нм). Наблюдение красного свечения объекта (в отраженном свете) после прохождения через запирающий светофильтр (515 нм) проводили в области >515–700 нм.

Счет клеток осуществляли в светлом поле в трех повторностях в счетной камере Горяева. Общее увеличение системы микроскопа было  $\times 100$  в процессе счета клеток и  $\times 1000$  при их регистрации (фотографировании). Относительная погрешность подсчета клеток в параллельных пробах не превышала 10%. Удельную суточную скорость роста микроводорослей и скорость их отмирания рассчитывали по приросту или убыли численности клеток в пробах по уравнению:

$$\mu = \ln(N_t - N_0),$$

где  $\mu$  – удельная скорость роста или отмирания водорослей, сут<sup>-1</sup>;  $N_0$  – исходная численность клеток,  $N_t$  – их численность через сутки.

Оценку фотохимической эффективности фотосистемы-2 ( $F_v/F_m$ ) микроводорослей осуществляли на двухвспышечном флуориметре, принцип работы и устройство которого разработаны на кафедре биофизики биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова (Погосян и др., 2009). Измерения проводили после 30 мин адаптации водорослей к темноте, чтобы все реакционные центры фотосистемы 2 перешли в открытое состояние. Во флуориметре реализован метод измерения начального уровня переменной флуоресценции ( $F_0$ ) при помощи коротких зондирующих

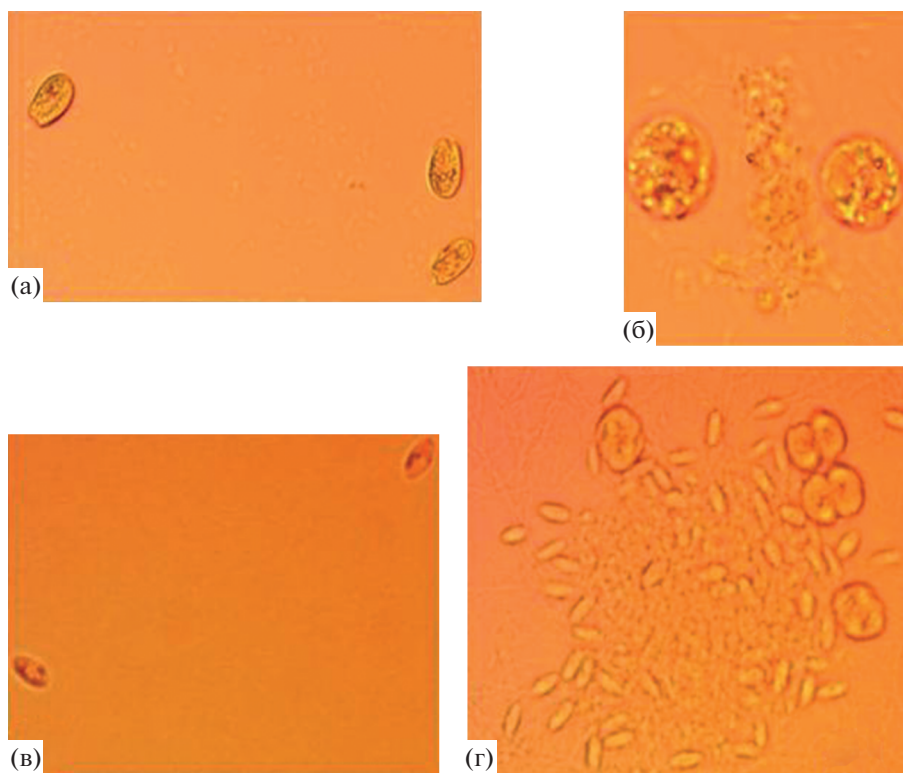
вспышек и ее максимального уровня ( $F_m$ ) при помощи насыщающей вспышки. По измеренным показателям рассчитывали переменную флуоресценцию  $F_v = F_m - F_0$  и  $F_v/F_m$ . Относительная погрешность определений величины  $F_v/F_m$  не превышала 5%. Величина  $F_0$ , как правило, хорошо коррелирует с концентрацией Хл *a* в клетках микроводорослей (Цилинский и др., 2018). Поэтому данный параметр использован нами в качестве показателя изменчивости концентрации Хл в клетках исследуемых водорослей в процессе их роста.

При статистической обработке данных вычисляли средние значения показателей и их стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вид клеток в исходных культурах микроводорослей *Tetrasetelmis viridis* и *Phaeodactylum tricornerutum* представлен на рис. 2а, 2в. В инфицированных соответствующими вирусами культурах уже на вторые сутки при насыщающих рост интенсивностях света и на третьи сутки при низких интенсивностях света выявлены клетки, изменившие форму и увеличившиеся в объеме в 3–4 раза по сравнению с исходной культурой (рис. 2б, 2г). Постепенно количество таких клеток возрастало. Увеличение в размерах клеток микроводорослей приводило к их последующей деструкции, что сопровождалось попаданием клеточного содержимого в окружающую среду.

**Эксперимент с культурой *Tetrasetelmis viridis*.** В условиях светового лимитирования роста водорослей в течение первых четырех суток наблюдалось постепенное увеличение численности клеток *T. viridis* в контроле и опыте (рис. 3а). Удель-



**Рис. 2.** Клетки микроводорослей до заражения (а, в) и после заражения вирусной инфекцией (б, г): а, б — *Tetraselmis viridis*, в, г — *Phaeodactylum tricornerum*.

ная скорость роста была  $0.24\text{--}0.48\text{ сут}^{-1}$  (табл. 1). К концу 4-х суток численность клеток в инфицированной вирусом культуре достигла максимума ( $3 \times 10^5$  кл./мл), что в  $\sim 4$  раза выше ее исходных значений. Затем произошло быстрое снижение численности клеток в результате их лизиса, который полностью завершился к концу 6-х суток. При этом на 5-е сутки эксперимента удельная скорость отмирания водорослей была  $-1.20\text{ сут}^{-1}$ , а на 6-е сутки возросла в  $\sim 5.5$  раза (табл. 1). Одновременно в контроле численность клеток *T. viridis* продолжала нарастать, достигнув стационарной фазы роста лишь к концу 5-х суток.

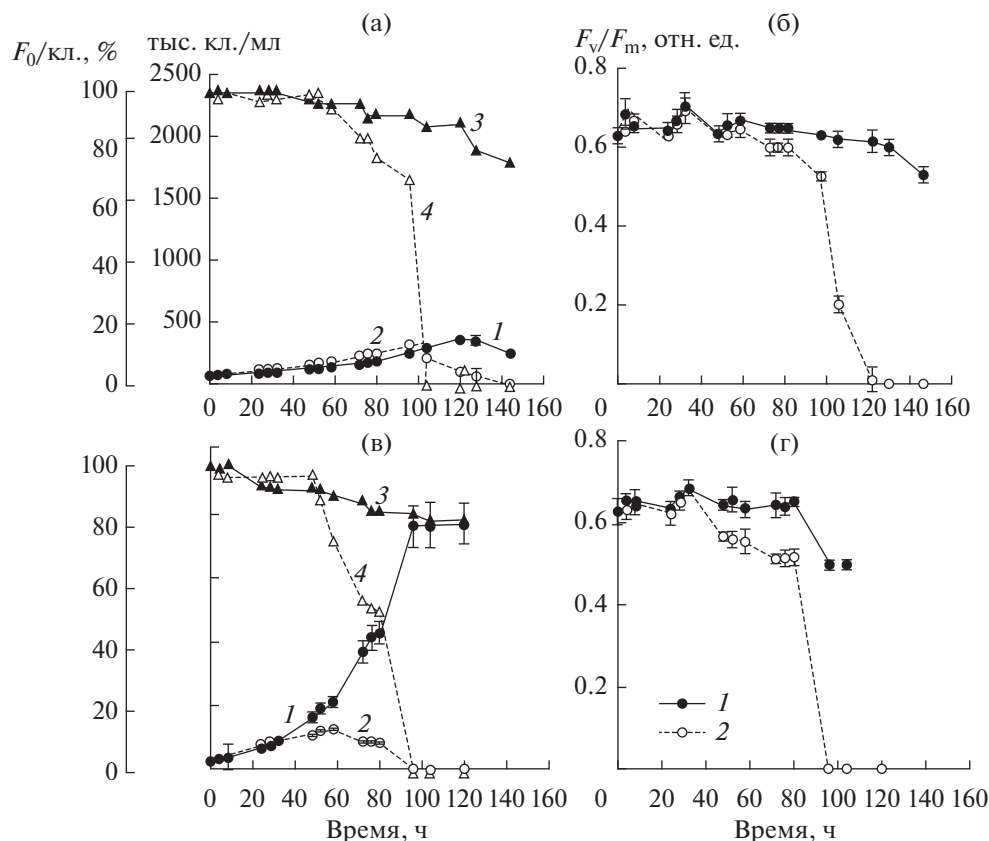
Начальный уровень флуоресценции в расчете на клетку  $F_0/\text{кл.}$  и  $F_v/F_m$  в процессе роста культуры *T. viridis* снижались и в контроле, и в опыте. Однако в контроле это снижение было слабым, тогда как в опыте уже в конце 5-х суток значения обоих параметров падали до нуля (рис. 3а, 3б).

Красная автофлуоресценция Хл *a* у *T. viridis* в контроле почти не изменялась в течение эксперимента, свечение охватывало большую часть клетки. В инфицированной вирусом культуре подобная картина наблюдалась только в первые сутки эксперимента. В конце 2–3-х суток красная автофлуоресценция Хл в преобладавших по численности видоизмененных клетках ослабевала, а на 5-е сутки была едва заметна.

При оптимальной для роста интенсивности света в течение первых суток численность клеток *T. viridis* возрастала и в контроле, и в опыте почти с одинаковой скоростью (рис. 3в). На 2-е сутки удельная скорость роста водорослей в опыте стала в 2.8 раза ниже контрольной (табл. 1). В результате к концу 2-х суток общая численность клеток в инфицированной культуре была на  $\sim 30\%$  меньше, чем в контроле и составляла  $3 \times 10^5$  кл./мл (рис. 3в). Затем инфицированная культура быстро отмирала, полный лизис наблюдался к концу 4-х суток. В этот период контрольная культура находилась в фазе экспоненциального роста. В контроле значения  $F_0/\text{кл.}$  и  $F_v/F_m$  в процессе роста накопительной культуры немного снижались, в опыте они достигали 0 уже к концу 4-х суток (рис. 3в, 3г).

В темноте в течение 10 сут численность клеток *T. viridis* в контроле варьировала в пределах нескольких процентов, а в инфицированной культуре на 10-е сутки она была лишь на 20% ниже исходной. Показатели  $F_0/\text{кл.}$  и  $F_v/F_m$  в контроле не изменялись, в опыте снизились незначительно (рис. 4а, 4б).

**Эксперимент с культурой *Phaeodactylum tricornerum*.** В условиях светового лимитирования роста культуры в контроле в течение всего эксперимента наблюдалось увеличение численности кле-



**Рис. 3.** Динамика численности клеток,  $F_0/\text{кл.}$  и  $F_v/F_m$  в культуре *Tetraselmis viridis* при низкой (а, б) и высокой (в, г) интенсивности света: а, в — численность клеток в контроле (1) и опыте (2),  $F_0/\text{кл.}$  в контроле (3) и опыте (4), б, г —  $F_v/F_m$  в контроле (1) и опыте (2). Даны средние значения и их стандартное отклонение.

ток (рис. 5а). Удельная скорость роста достигала  $0.49\text{--}0.91 \text{ сут}^{-1}$  (табл. 1). В инфицированной культуре ее интенсивный рост отмечен лишь в начале эксперимента ( $0.69 \text{ сут}^{-1}$ ). На 2-е сутки скорость прироста инфицированной культуры водорослей была незначительна ( $0.13 \text{ сут}^{-1}$ ), а численность клеток достигала максимума —  $18 \times 10^5 \text{ кл./мл}$ , что в 2.3 раза выше ее исходных значений. Уже на 3-и сутки водоросли начинали интенсивно отмирать, а на 4-е произошел их полный лизис. Параметры  $F_0/\text{кл.}$  и  $F_v/F_m$  в контроле изменялись слабо (рис. 5а, 5б), в инфицированной культуре они постепенно снижались до нуля.

При оптимальной для роста *Ph. tricornutum* интенсивности света численность клеток в течение первых суток возрастала и в контроле, и в инфицированной культуре (рис. 5в). В начале 2-х суток эксперимента удельная скорость роста культуры, находившейся в контакте с вирусами, была во много раз ниже относительно контроля (табл. 1). К концу 2-х суток численность клеток в инфицированной культуре была в  $\sim 3.8$  раза меньше контрольной и составляла  $18 \times 10^5 \text{ кл./мл}$  (рис. 5в). Затем произошло ее быстрое отмирание (табл. 1),

завершившееся полным лизисом клеток к концу 4-х суток. Значения  $F_0/\text{кл.}$  и  $F_v/F_m$  в процессе роста культуры снижались в контроле значительно слабее, чем в опыте, в инфицированной вирусом культуре к концу эксперимента они достигли нуля (рис. 5в, 5г).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последние годы в различных районах Мирового океана проведены исследования по количественной оценке влияния вирусного лизиса на смертность фитопланктона с помощью модифицированного метода разведения (Baudoux et al., 2008; Mojica et al., 2016; Pasulka et al., 2015). Показано, что в Северном море за лето 2003 г. в результате вирусного лизиса пикофитопланктона в окружающую среду попало в среднем 8% органического углерода, синтезированного пикофракцией фитопланктона, в отдельных случаях его содержание достигало 32% (Baudoux et al., 2008). В Калифорнийском течении в октябре 2008 г. смертность фитопланктона при совместном влиянии микрозоопланктона и вирусов была в среднем на 38% выше, чем при влиянии только мик-

**Таблица 1.** Удельная скорость роста и убыли ( $\mu$ ) клеток в культурах водорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornerutum* при лимитирующей рост интенсивности света (I) и насыщающей интенсивности (II)

Время, сут	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	
	I	II
<i>Tetraselmis viridis</i>		
1	$0.24 \pm 0.04$	$0.88 \pm 0.15$
	$0.48 \pm 0.08$	$1.02 \pm 0.20$
2	$0.24 \pm 0.05$	$0.87 \pm 0.17$
	$0.24 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.08$
3	$0.48 \pm 0.09$	$0.81 \pm 0.15$
	$0.48 \pm 0.070$	$(-0.23) \pm (0.06)$
4	$0.24 \pm 0.04$	$0.72 \pm 0.13$
	$0.24 \pm 0.03$	$(-6.28) \pm (-0.28)$
5	$0.10 \pm 0.03$	0
	$(-1.20) \pm (-0.32)$	—
6	$(-0.36) \pm (-0.07)$	—
	$(-6.68) \pm (-0.22)$	—
<i>Phaeodactylum tricornerutum</i>		
1	$0.91 \pm 0.02$	$1.39 \pm 0.09$
	$0.69 \pm 0.07$	$0.83 \pm 0.07$
2	$0.87 \pm 0.07$	$0.78 \pm 0.06$
	$0.13 \pm 0.04$	$(-0.05) \pm (-0.02)$
3	$0.63 \pm 0.04$	$0.67 \pm 0.03$
	$(-0.11) \pm (-0.03)$	$(-0.16) \pm (-0.03)$
4	$0.49 \pm 0.03$	0
	$(-3.84) \pm (0.22)$	$(-8.00) \pm (-0.75)$

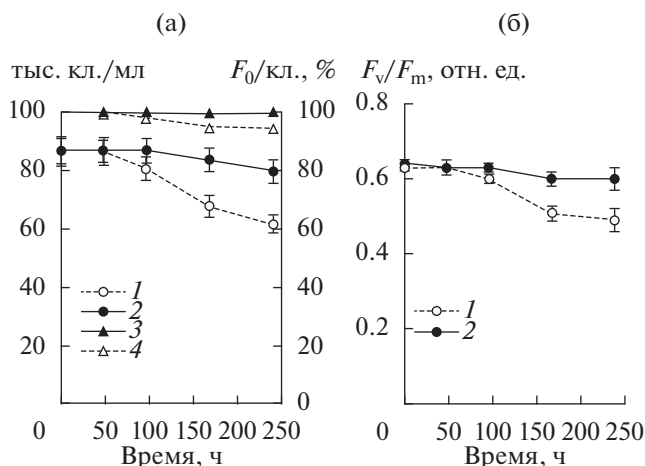
Примечание. Над чертой — контроль, под чертой — опыт. Приведены средние значения и их стандартное отклонение, “—” — данные отсутствуют.

розоопланктона (Pasulka et al., 2015). В Северной Атлантике в июле–августе 2009 г. скорость гибели пикоцианобактерий и эукариотического пикофитопланктона в результате вирусного лизиса достигала  $0.14\text{--}0.23$  сут<sup>-1</sup>, что соответствует 20–30% их максимальной удельной скорости роста (Mojica et al., 2016). Полученные результаты позволяют судить о важной роли альговирусов в морских экосистемах. Однако до настоящего времени не совсем ясно, как абиотические факторы среды, и прежде всего свет, влияют на скорость лизиса фитопланктонных клеток. В море в силу методических и методологических трудностей это выяснить крайне сложно. Ситуацию могут прояснить лабораторные эксперименты на отдельных видах водорослей в контролируемых условиях.

В настоящих исследованиях, проведенных на морских микроводорослях *Tetraselmis viridis* и

*Phaeodactylum tricornerutum*, были использованы максимальные концентрации альговирусов, численность которых на один–два порядка превышала таковую водорослей. Такой подход обычно применяют в экспериментах по изучению контакта альговирусов с их хозяевами — микроводорослями (Pagarete et al., 2015). Высокая концентрация вирусов в среде обычно обеспечивает наиболее быстрое инфицирование водорослей. По нашим данным, начало инфицирования *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornerutum* зависело от световых условий. Оптимальные световые условия способствовали быстрому увеличению численности и активности клеток — хозяев альговирусов TsV-S1 и PtV-S18. При насыщающей рост водорослей интенсивности света видоизмененные клетки, вероятно, инфицированные вирусом, отмечали уже через сутки от начала эксперимента. При снижении интенсивности света в 3–5 раз этот процесс наблюдали на 1 сут позже. Определение флуоресцентных параметров позволило выявить снижение внутриклеточного содержания Хл *a* в водорослях по мере усиления их инфицирования вирусами. Изменение формы и размеров инфицированных клеток, а также деградация внутриклеточных пигментов ранее показаны на культурах кокколитофориды *Emiliania huxleyi* (Lohmann) W.W. Hay & H.P. Mohler (Bidle et al., 2007), зеленой микроводоросли *Tetraselmis striata* Butcher (Pagarete et al., 2015) и диатомовой водоросли *Chaetoceros tenuissimus* Meunier (Kimura, Tomaru, 2015).

Одновременно со структурными изменениями в инфицированных вирусами культурах исследованных водорослей происходило снижение  $F_v/F_m$ . По мнению Бидле и др. (Bidle et al., 2007), осуществляется перестройка метаболизма в клетках водорослей и активация экспрессии белка метакаспазы, необходимой для воспроизводства вирусных частиц. Разрыв клеточной оболочки водорослей, инфицированных вирусом, происходит обычно в тот момент, когда численность вирусов в цитоплазме клеток хозяина достигает ~100 вирионов на клетку (Kim et al., 2015). Несмотря на ослабление функциональной активности инфицированных водорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornerutum*, отмечено дальнейшее увеличение количества их клеток до определенной численности, которую условно можно назвать пороговой. Только после достижения пороговой численности клеток в исследованных культурах, инфицированных альговирусами, отмечено быстрое их отмирание вследствие вирусного лизиса. Интервал от момента внесения в среду вирусов до полного лизиса их хозяев составил 4–6 сут. Аналогичные результаты получены ранее на культурах кокколитофориды *Emiliania huxleyi* (Bidle et al., 2007), зеленой микроводоросли *Tetraselmis striata* (Pagarete et al., 2015) и диатомо-

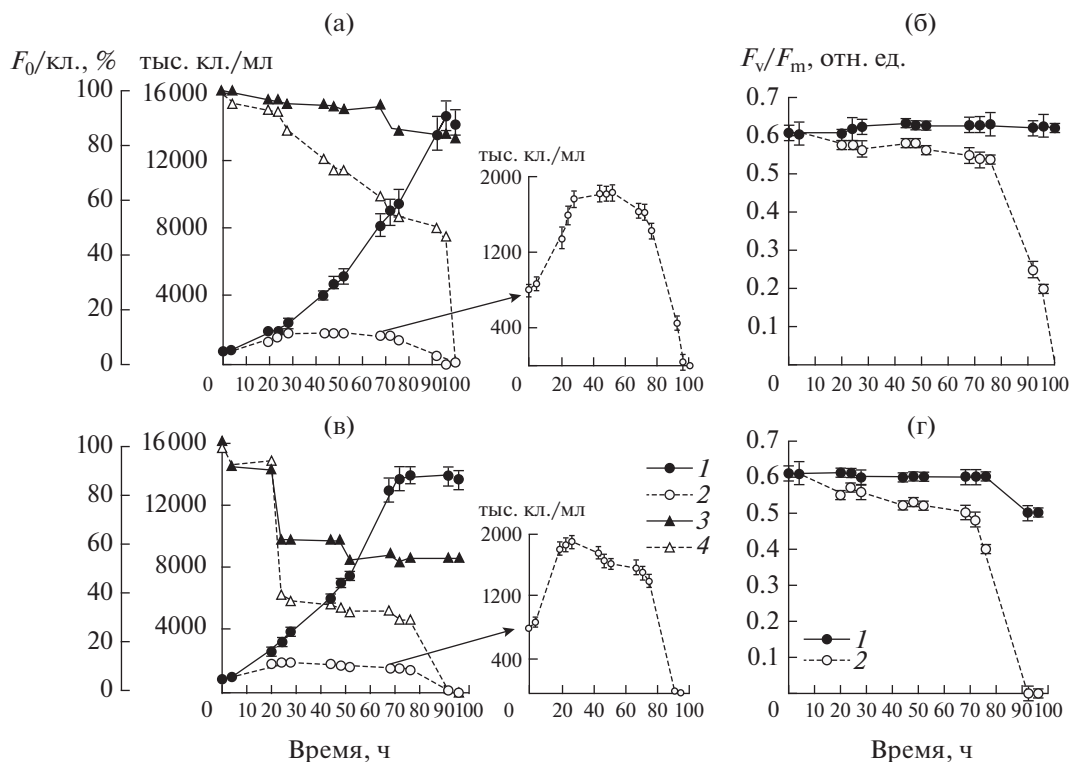


**Рис. 4.** Динамика численности клеток,  $F_0/кл.$  и  $F_v/F_m$  в культуре *T. viridis* в темноте: а – численность клеток в опыте (1) и контроле (2),  $F_0/кл.$  в опыте (3) и контроле (4), б –  $F_v/F_m$  в опыте (1) и в контроле (2). Даны средние значения и их стандартное отклонение.

вой водоросли *Chaetoceros tenuissimus* (Kimura, Tomaru, 2015). В настоящем исследовании, прирост численности клеток в темноте не наблюдался, поэтому влияние вирусов на микроводоросли было незначительным. Вероятно, при неблаго-

приятных условиях, например при недостаточном освещении, активная вирусная инфекция, вызывающая лизис клеток хозяина, переходит в состояние лизогении (переживание вируса внутри клетки своего хозяина) (Wommack, Colwell, 2000).

Экстраполируя наши и ранее опубликованные другими авторами (Bidle et al., 2007; Kimura, Tomaru, 2015; Pagarete et al., 2015) данные на природные популяции фитопланктона, мы полагаем, что деградация “цветения воды” фитопланктоном может произойти в течение нескольких суток. Вероятно, процесс вирусного лизиса клеток микроводорослей будет интенсивно осуществляться только в верхней части зоны фотосинтеза, где свет не лимитирует рост представителей фитопланктона. В результате этого поток вещества и энергии от фитопланктона на высшие трофические уровни резко сократится. При этом большое количество органического вещества, попавшее в окружающую среду вследствие вирусного лизиса водорослей, может служить основой для усиленного роста бактерий и других одноклеточных организмов (Stepanova, 2017; Wommack, Colwell, 2000). У основания фотосинтетической зоны роль вирусов в гибели фитопланктонных клеток, вероятно, будет незначительна.



**Рис. 5.** Динамика численности клеток,  $F_0/кл.$  и  $F_v/F_m$  в культуре *Phaeodactylum tricorutum* при низкой (а, б) и высокой (в, г) интенсивности света: а, в – численность клеток в контроле (1) и опыте (2),  $F_0/кл.$  в контроле (3) и опыте (4); б, г –  $F_v/F_m$  в контроле (1) и опыте (2). Даны средние значения и их стандартное отклонение.

**Выводы.** Показано, что даже при высокой концентрации вирусов в экспериментах начало инфицирования клеток водорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum tricornerum*, зарегистрированное по увеличению их объема, а также снижению красной автофлуоресценции Хл *a*, переменной флуоресценции и фотохимической эффективности фотосистемы 2, зависело от световых условий и исходной численности клеток микроводорослей. Повышение интенсивности света и начального количества клеток водорослей вызывало усиление этих процессов, выявленных на 2–е–3–и сутки от начала эксперимента. Снижение количества водорослей в результате вирусного лизиса отмечено на одни-двое суток позже. Выявлена пороговая численность клеток микроводорослей, при которой наблюдалось начало их деструкции под действием вирусов. Независимо от световых условий, для *T. viridis* она была  $3 \times 10^5$  кл./мл, а для *Ph. tricornerum* – в 6 раз выше. Полный лизис клеток исследованных культур выявлен к концу 4–6-х суток. В темноте влияние вирусной инфекции на процесс отмирания клеток водорослей крайне слабое.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа подготовлена в рамках государственного задания ФИЦ “Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН” № АААА-А18-118021490093-4 “Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом” и по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2019-0003 “Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Парсонс Т.Р., Такахашии М., Харгрейв Б. 1982. Биологическая океанография. Москва: Легк. и пищ. пром-сть.
- Погосян С.И., Гальчук С.В., Казимирко Ю.В. и др. 2009. Применение флуориметра “Мега-25” для определения количества фитопланктона и оценки состояния его фотосинтетического аппарата // Вода: химия и экология. № 2. С. 34.
- Цилинский В.С., Суслин В.В., Финенко З.З. 2018. Сезонная динамика эффективности работы фотосинтетического аппарата фитопланктона в прибрежных районах Черного моря // Океанология. Т. 58. № 3. С. 593.  
https://doi.org/10.1134/S0001437018040112
- Baudoux A., Noordeloos A., Veldhuis M., Brussaard C. 2006. Virally induced mortality of *Phaeocystis globosa* during two spring blooms in temperate coastal waters // Aquat. Microb. Ecol. V. 44. P. 207.  
https://doi.org/10.3354/ame044207
- Baudoux A.C., Veldhuis M.J.W., Noordeloos A.A.M. et al. 2008. Estimates of virus-vs. grazing, induced mortality of picophytoplankton in the North Sea during summer // Aquat. Microb. Ecol. V. 52. P. 69.  
https://doi.org/10.3354/ame01207
- Beckett S.J., Weitz J.S. 2018. The Effect of Strain Level Diversity on Robust Inference of Virus-Induced Mortality of Phytoplankton // Front. Microbiol. V. 9. P. 1850.  
https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01850
- Bidle K.D., Haramaty L., Barcelos e Ramos J., Falkowski P. 2007. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore *Emiliania huxleyi* // PNAS. V. 104(14). P. 6049.  
https://doi.org/10.1073/pnas.0701240104
- Bratbak G., Heldal M., Egge J.K. 1993. Termination of algal blooms: viral mortality of the marine coccolithophorid *Emiliania huxleyi* // Mar. Ecol. Prog. Ser. V. 93. P. 39.  
https://doi.org/10.3354/meps093039
- Bratbak G., Wilson W., Heldal M. 1996. Viral control of *Emiliania huxleyi* blooms? // J. Marine Systems. V. 9. № 1–2. P. 75.  
https://doi.org/10.1016/0924-7963(96)00018-8
- Cottrell M.T., Suttle C.A. 1995. Dynamics of a lytic virus infecting the photosynthetic marine picoflagellate *Micromonas pusilla* // Limnol., Oceanogr. V. 40. P. 730.  
https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.4.0730
- Evans C.S., Arscher S.D., Jacquet S., Wilson W.Y. 2003. Direct estimates of the contribution of viral lysis and microzooplankton grazing to the decline of a *Micromonas* spp. population // Aquat. Microb. Ecol. V. 30. P. 207.  
https://doi.org/10.3354/ame030207
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve // Can. J. Microbiol. V. 8. P. 229.
- Horas E.L., Theodosiou L., Becks L. 2018. Why Are Algal Viruses Not Always Successful? // Viruses. V. 10. № 9. P. 474.  
https://doi.org/10.3390/v10090474
- Kim J.J., Yoon S.H., Choi T.J. 2015. Isolation and physiological characterization of a novel virus infecting *Stephanopyxis palmeriana* (Bacillariophyta) // Algae. V. 30(2). P. 81.  
https://doi.org/10.4490/algae.2015.30.2.081
- Kimura K., Tomaru Yu. 2015. Discovery of Two Novel Viruses Expands the Diversity of Single-Stranded DNA and Single-Stranded RNA Viruses Infecting a Cosmopolitan Marine Diatom // Appl. Environ. Microbiol. V. 81. P. 1120.  
https://doi.org/10.1128/AEM.02380-14
- Lehahn Y., Koren I., Schatz D. et al. 2014. Decoupling physical from biological processes to assess the impact of viruses on a mesoscale algal bloom // Curr. Biol. V. 24. P. 2041.  
https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.046
- Mojica K.D.A., Huisman J., Wilhelm S.W., Brussaard C.P.D. 2016. Latitudinal variation in virus-induced mortality of phytoplankton across the North Atlantic Ocean // ISME J. V. 10. P. 500.  
https://doi.org/10.1038/ismej.2015.130
- Pagarete A., Grébert T., Stepanova O. et al. 2015. Tsv-N1: A Novel DNA Algal Virus that Infects *Tetraselmis striata* // Viruses. V. 7. P. 3937.  
https://doi.org/10.3390



- Pasulka A.L., Samo T.Y.J., Landry M.L.* 2015. Grazer and viral impacts on microbial growth and mortality in the southern California Current Ecosystem // *J. Plankton Res.* V. 37(2). P. 320.  
<https://doi.org/10.1093/plankt/fbv011>
- Stepanova O.A.* 2016. Black Sea algal viruses // *Russ. J. Mar. Biol.* V. 42. № 2. P. 99.  
<https://doi.org/10.1134/S1063074016020103>
- Stepanova O.A.* 2017. Interaction between Algal Viruses and the Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 (Bivalvia: Mytilidae) in Experiment // *Russ. J. Mar. Biol.* V. 43. № 2. P. 127.  
<https://doi.org/10.1134/S1063074017020110>
- Suttle C.A.* 2007. Marine viruses: major players in the global ecosystem // *Nat. Rev. Microbiol.* V. 5. P. 801.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
- Suttle C.A., Chan A.M., Cottrell M.T.* 1990. Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity // *Nature.* V. 347. P. 467.
- Vardi A., Van Mooy B.A.S., Fredricks H.F. et al.* 2009. Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton // *Science.* V. 326. P. 861.  
<https://doi.org/10.1126/science.1177322>
- Wommack K.E., Colwell R.R.* 2000. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* V. 64. № 1. P. 69.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.64.1.69-114.2000>

## The Effect of Viral Infection on the Functioning and Lysis of the Black Sea Microalgae *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) and *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta)

L. V. Stelmakh<sup>1,\*</sup> and O. A. Stepanova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russia*

<sup>2</sup>*Federal State Budgetary Scientific Institution (FSBSI) "Institute of Nature and Technical Systems" of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, Russia*

\*e-mail: [lustelm@mail.ru](mailto:lustelm@mail.ru)

Experimental studies were performed on *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara (Chlorophyta) and *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyta) cultures of the Black Sea microalgae using algal virus strains for these algae – TsV-S1 and PtV-S18, isolated from the Black Sea ecosystem. The influence of the light intensity and the initial abundance of microalgae cells on the beginning of their infection by viruses and on the decline their abundance due to lysis was revealed. Already on the second–third day in the cultures infected by viruses, cells changed their shape and increased in volume. At the same time, there was a decrease in chlorophyll *a* red autofluorescence, variable fluorescence per cell, and photochemical efficiency of photosystem 2. The beginning of a decrease in the abundance of cells in the studied cultures due to viral lysis was noted one to two days later. The threshold cell abundance, at which this process was observed was independent of light conditions and was  $3 \times 10^5$  cells/mL for *T. viridis* and  $18 \times 10^5$  cells/mL for *Ph. tricornutum*. Complete lysis of algae cells was detected by the end of the fourth – sixth day. In the dark, there was a slight effect of viruses on microalgae.

**Keywords:** marine microalgae, algal viruses, phytoplankton, Black Sea