

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОГО ЛИЗИСА НА ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА КУЛЬТУРОЙ ЧЕРНОМОРСКОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Tetraselmis viridis*

© 2024 г. С.А. Шоларь*,#, О.А. Степанова**,##

*ФИЦ «Морской гидрофизический институт РАН», Капитанская ул., 2, Севастополь, 299011, Россия

#E-mail: sa.sholar@mail.ru

**Институт природно-технических систем РАН, ул. Ленина, 28, Севастополь, 299011, Россия

##E-mail: solar-ua@ya.ru

Поступила в редакцию 27.02.2023 г.

После доработки 03.03.2023 г.

Принята к публикации 16.06.2023 г.

С помощью спектрофотометрии изучено влияние вирусного лизиса на поглощение света в инфицированной вирусом культуре микроводоросли *Tetraselmis viridis* на фоне контрольного роста неинфицированной культуры. Отработаны некоторые методические особенности проведения многодневных экспериментов с учетом природных титров альговирусов, равных объемов составных микробиоты (альговирусы или питательная среда, культуры микроводоросли) и условий (температура, освещенность) в опыте и контроле с предотвращением возможности вирусной контаминации микроводоросли в контроле. Установлено, что в динамике экспериментов во время разрушения (лизиса) хозяев вирусов (клеток микроводоросли) отмечается увеличение количества растворенного органического вещества.

Ключевые слова: *Tetraselmis viridis*, поглощение света, спектрофотометрия, интегрирующая сфера, морские альговирусы, микробиота.

DOI: 10.31857/S0006302924020125, EDN: OTYFVU

Автохтонные вирусы водоемов, являясь самыми многочисленными среди гидробионтов, занимают ключевую позицию в экологическом контроле планктонных микроорганизмов, в том числе представителей значимого в глобальной экологии нашей планеты фитопланктона [1, 2]. Известно, что вирусы, в том числе и водные, могут быстро лизировать (разрушать до растворимого состояния) своих одноклеточных хозяев и в ряде случаев очищать мутную водную среду их обитания, что предлагалось применять в практике для прекращения «цветения» цианобактерий в естественных и искусственных водоемах [3]. На основании литературных данных логично утверждать, что вирусный лизис вызывает заметные изменения форм, размеров и численности своих одноклеточных хозяев (бактерий, микроводорослей, простейших), что в итоге приводит к изменению оптических свойств, например, поглощения, рассеяния и затухания света водной среды их обитания. Анализ имеющихся сведений по данной проблеме отражен в литературном обзоре [4], куда были включены и наши первые результаты изучения возможной роли вирусного лизиса в оптике моря с использованием изобретенной на базе Морского гидрофизического института лабо-

раторной установки [5]. Таким образом, следует резюмировать, что вирусная инфекция оптически значимых биологических частиц (бактерий, микроводорослей, простейших) представляет собой еще один процесс, который может быстро трансформировать планктонные клетки в новые типы оптически значимого материала (окрашенное растворенное органическое вещество и детрит, в том числе осколки и обломки разрушенных в результате вирусного лизиса клеток-хозяев вирусов). Следовательно, вирусный лизис в гидросфере оказывает значительное влияние на оптические свойства воды, в том числе и морской. Такой современный подход настоятельно рекомендует учитывать водные вирусы и вирусный лизис в физике (оптике) моря, как и всей гидросферы.

Особый интерес у исследователей вызывает вирусный лизис фитопланктона, являющегося основой водной, как и морской, пищевой цепи и играющего жизненно важную роль в обогащении среды, в том числе и атмосферы, кислородом; в углеродном цикле, при поглощении CO₂ из атмосферы, что, в свою очередь, отражается и на климате нашей планеты. По данным исследователей, прекращение «цветения» (сезонный пик числен-

ности) фитопланктона вирусной инфекцией может сместить баланс между эукариотическими и прокариотическими переработчиками его биомассы [6].

Для некоторых представителей фитопланктона процесс вирусного лизиса, в том числе и на уровне оптических изменений, подробно описан, что отражено в нашем литературном обзоре [4]. Однако для многих других значимых для экологии гидросферы представителей фитопланктона таких исследований пока проведено не было. В частности, вирусный лизис черноморских микроводорослей, в том числе определяемых учеными как наиболее распространенных в Черном море [7], изучен пока недостаточно. По нашему мнению, вирусный лизис каждого отдельного вида микроводорослей может отличаться своими особенностями и спецификой, в том числе и в изменениях оптических характеристик, сопутствующих контакту вируса с клетками хозяина в водной среде их обитания.

Широко распространенная в черноморской среде микроводоросль *Tetraselmis viridis* относится к наиболее перспективным источникам биологически ценных продуктов из микроводорослей, стимулирующих рост и выживаемость личинок рыб и повышающих качество конечной продукции [8–12]. Из литературных данных известно, что в морских видах микроводорослей определяется высокое содержание полиненасыщенных жирных кислот, которые важны не только для аквакультуры, но и для здоровья человека, особенно ω_3 - и ω_6 -кислоты [13–15].

Цель работы — путем экспериментов с использованием спектрофотометрии установить изменения поглощения света черноморской микробиоты, в состав которой включали культуру микроводоросли *Tetraselmis viridis*, моделируя пик «цветения», и альговирус этой микроводоросли.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали жидкую альгологически чистую культуру микроводоросли *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980 из коллекции живых культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (Севастополь, Россия), которую в дальнейшем поддерживали в стабилизирующей питательной среде Гольдберга в лабораторных условиях на базе Института природно-технических систем РАН. В качестве альговируса этой микроводоросли использовали штамм TvV-S11, свойства которого, как и состав его генома, описаны ранее [16, 17]. Инфекционный титр альговируса в ходе опытов для контакта с клетками микроводоросли применяли в

приближенном к природным значениям величинам — 10^5 IE/мл [16].

Эксперименты выполняли с использованием в опыте смеси в бактериологической пробирке культуры микроводоросли объемом 4.0 мл и вирусной суспензии объемом 1.0 мл. В контроль, кроме культуры микроводоросли в объеме 4.0 мл, добавляли пастеризованную морскую воду или стабилизирующую питательную среду Гольдберга в идентичном вирусной суспензии объеме — 1.0 мл. Такие условия — близкое к природному значение инфекционного титра альговируса, соответствующее понятиям его концентрации, а также подготовка опыта и контроля в описанных объемах (4 к 1) позволили замедлить и продлить процесс вирусного лизиса на несколько дней, что дало возможность проводить спектрофотометрическое исследование до семи суток.

Измерения проводили с помощью спектрофотометра MC 122A (ООО «СОЛ инструментс», Минск, Беларусь) в кювете 1 см, для чего из бактериологических пробирок, где размещали опыт и контроль, отбирали аликвоты (по 3.5 мл) один раз в день в утренние часы. Для измерения «нуля» использовали стабилизирующую среду Гольдберга, применяемую для поддержания культуры микроводоросли в логарифмической фазе роста в лабораторных условиях. Поскольку исследование в данном направлении (спектрофотометрическое изучение вирусного лизиса черноморской микробиоты в динамике) проводилось нами впервые, это потребовало отработки не только определенных условий в подготовительном процессе экспериментов, но и некоторого усовершенствования в методическом плане, например, учета того, что кюветы могут загрязняться альговирусом, а это предполагает контаминацию контроля, а также возможное испарение содержимого опытных и контрольных проб и др.

Логично, что для предотвращения возможной вирусной контаминации контрольной пробы в первую очередь изучали аликвоту неинфицированной культуры микроводоросли. Затем после промывки кюветы дистиллированной водой (для устранения возможного повышения концентрации клеток в опыте за счет оставшихся в кювете клеток из контроля) приступали к спектрофотометрическим измерениям инфицированной микроводоросли из опытной пробы. После этого кювету промывали вначале проточной, а затем дистиллированной водой и оставляли в дистилляте до начала следующих измерений (до утра). Перед измерением кювету обрабатывали спиртом, высушивали феном, ополаскивали дистиллированной водой, оставляя с дистиллированной водой не менее чем на 30 мин. Перед каждым измерением кюветы протирали хлопчатобумажной тканью.

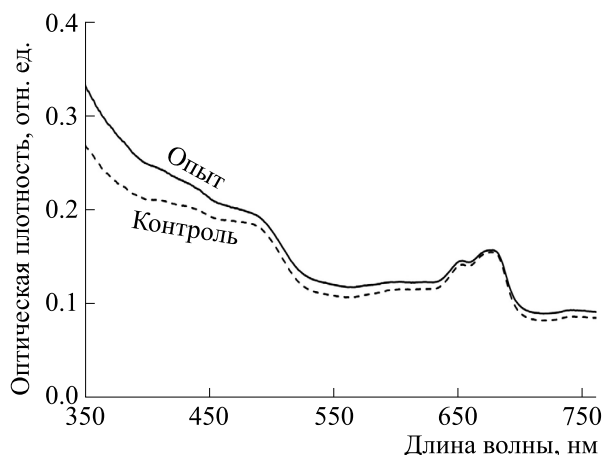


Рис. 1. Спектры поглощения света культурой *Tetraselmis viridis* на момент начала эксперимента (в течение часа). Пунктирная линия — контроль роста и развития культуры (без альговируса); сплошная линия — опыт, контакт клеток культуры микроводоросли с альговирусом (инфицированная альговирусом культура микроводоросли).

В содержимое пробирок опытных и контрольных проб после измерений доливали дистиллированную воду до начального уровня, начиная со вторых суток и до конца эксперимента, это было сделано для исключения расхода на испарение и остатки аликвот на стенках измерительной кюветы.

Спектрофотометрические измерения в аликвотах опытных и контрольных проб проводили трехкратно для получения и подтверждения стабильного результата. Используемый спектрофотометр был оснащен устройством диффузного пропускания и отражения с интегрирующей сферой [18], кювета размещалась перед интегрирующей сферой в кюветодержателе устройства.

В ходе проводимых экспериментов комнатное освещение было в пределах 250–300 лк (в зависимости от погоды и сезона), температура — 20°C — 24°C (комнатная).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения культуры из опыта (инфицированная альговирусом культура) и контроля (неинфицированная культура) используемой в эксперименте микроводоросли *T. viridis* в первый день эксперимента представлены на рис. 1.

Так как в «опытной» пробе, кроме живых клеток микроводоросли, присутствует вирусная суспензия (вирусный лизат с наличием обломков и осколков разрушенных и лизированных клеток), а в «контрольной» пробе — питательная среда, логично предположить, что в коротковолновой области спектра значения D в опыте (культура микроводоросли с вирусной суспензией) больше, чем

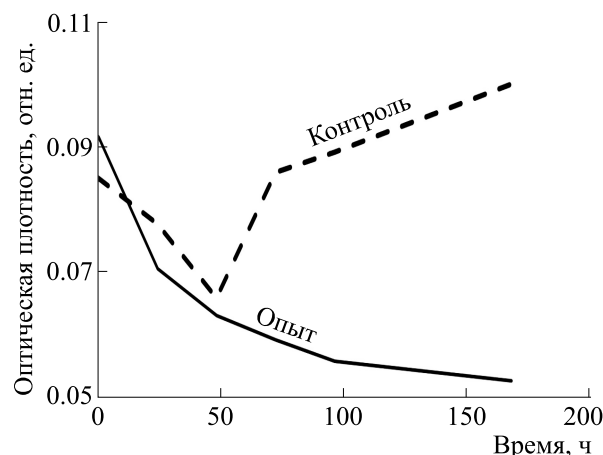


Рис. 2. Зависимость оптической плотности культуры микроводоросли на длине волны 750 нм от времени.

в контроле (культура микроводоросли с питательной средой). Полученные в ходе экспериментов спектры (рис. 1) сравнимы с данными работ других исследователей, где представлены спектры изучаемой культуры микроводоросли [21].

На рис. 2 представлен график зависимости D_{750} (оптическая плотность D на длине волны 750 нм) от шкалы времени. Показатель D_{750} является косвенным показателем численности клеток используемых в экспериментах культур микроводорослей [20, 21].

В первые 48 ч на графике отражена адаптация культуры [19], как в контроле, так и в опыте. При этом первоначально отмечается снижение D_{750} , но с дальнейшим ростом в контроле (рост и развитие культуры) и продолжающимся снижением в опыте, что обусловлено вирусным лизисом («растворением» или разрушением) клеток.

На рис. 3 представлена динамика изменения спектра поглощения света инфицированной альговирусом культурой в ходе эксперимента (от 0 ч до 168 ч).

Уже в первые сутки (24 ч) наблюдается заметное на графике снижение оптической плотности по сравнению с первоначальными значениями с дальнейшим уменьшением и исчезновением пиков поглощения на длине волны 675 нм и двух пиков на длинах волн 475 нм и 425 нм.

На рис. 4 показаны спектры поглощения света культурой микроводоросли в опытной и контрольной пробах в последний день эксперимента (спустя 168 ч).

Спектр поглощения света «контрольной» культуры (без вирусного лизиса) соответствует спектрам культуры *T. viridis*, представленным в работе других исследователей [21]. В результате вирусного лизиса спектр «опытной» культуры, в отличие от спектра контроля, не имеет пиков в

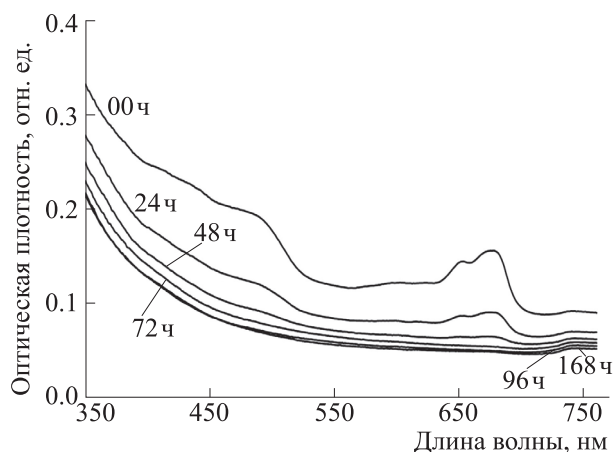


Рис. 3. Спектры поглощения света культурой *Tetraselmis viridis*, зараженной альговирусом TvV (штамм TV-S11).

области каротиноидов (440 и 475 нм) и хлорофилла *a* (675 нм). Также в спектре «опытной» культуры наблюдается максимум в коротковолновой области, что свидетельствует о наличии растворенного органического вещества. О подобных фактах упоминалось и в работах других исследователей [4, 22].

На протяжении пяти суток каждые 24 ч проводили фотографирование исследуемых образцов («опытные» и «контрольные» пробирки), также фотографии были сделаны через 168 ч. Фотографии делали в утренние часы перед началом измерений в спектрофотометре. Полученные фото представлены на рис. 5. Видно, что в первый день эксперимента (0 ч) нет видимых различий между контролем и опытом, однако через 48 ч эти разли-

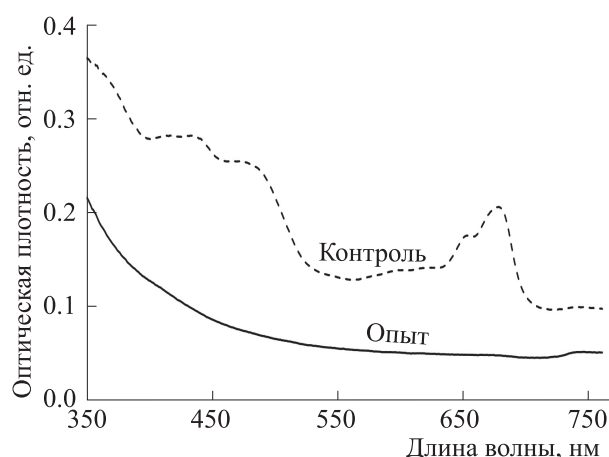


Рис. 4. Спектр поглощения света культурой *Tetraselmis viridis* через 168 ч. Сплошная линия — контроль (культура микроводоросли без альговируса), пунктирная линия — опыт (культура с добавлением альговируса).

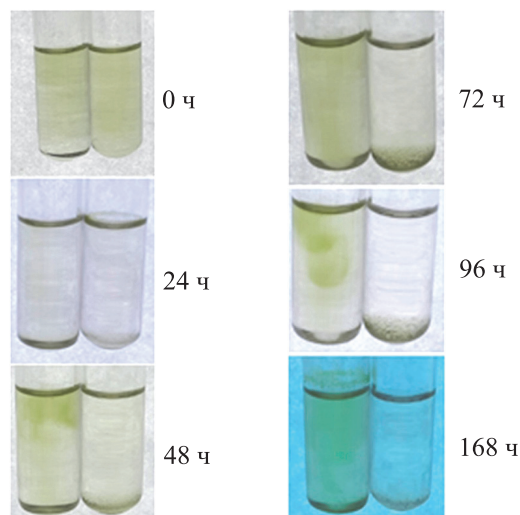


Рис. 5. Фотографии «опытных» и «контрольных» пробирок с культурой *Tetraselmis viridis* на разных сроках эксперимента: слева — контроль, справа — опыт (инфицированная альговирусом культура).

чия становятся заметны невооруженным глазом. Отличия заметны и на протяжении всего эксперимента, длительность которого составила 168 ч.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Впервые методом спектрофотометрии были проведены исследования динамики процесса вирусного лизиса культуры черноморской микроводоросли *Tetraselmis viridis* (опыт) в сравнении с процессом роста неинфицированной культуры («контроль»).

В ходе экспериментов были разработаны некоторые методические особенности постановки многодневных экспериментов с учетом природных титров альговирусов, равных объемов составных микробиоты (альговирусы или питательная среда, культуры микроводоросли) и условий (температура, освещенность) в опыте и контроле для предотвращения возможности вирусной контаминации микроводоросли в контроле.

Было установлено, что вирусный лизис изучаемой культуры *Tetraselmis viridis* приводил к изменению спектров поглощения света этой культурой и уменьшению численности клеток, причем сходные результаты были получены при трехкратном повторении эксперимента. Во время разрушения клеток «хозяев» в результате вирусного лизиса отмечается увеличение количества растворенного органического вещества.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания по госбюджетной теме МГИ РАН

FNNN-2024-0012 «Оперативная океанология» и ИПТС № 0012-2021-0010 «Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fuhrman J. A. and Suttle C. A. Viruses in marine planktonic systems. *Oceanography*, **6** (2), 51–63 (1993). DOI: 10.5670/oceanog.1993.14
- Suttle C. A. Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature Rev. Microbiol.*, **5** (10), 801–812. (2007). DOI: 10.1038/nrmicro1750
- Mendzhul M. I., Lysenko T. G., and Syrchin S. A. Development of cyanobacterial phages at the Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine (History and perspectives). *Mikrobiol. Zhurn.*, **65** (1), 133–140 (2003). EDN: OHZKQG
- Sholar S. A. and Stepanova O. A. The Role of Viruses and Viral Lysis in Changing the Optical Properties of the Water Environment of their Habitat. *Biophysics*, **66** (2), 182–191 (2021). DOI: 10.1134/S0006350921020226
- Ли М. Е. Г. и Шоларь С. А. Мобильная установка для определения в режиме удаленного доступа влияния штаммов черноморских альговирусов и вирусного лизиса представителей фитопланктона на оптико-физические свойства морской воды. Патент РФ на изобретение № 2759907 С1, Бюл. № 32 (2021). EDN: RSLILU
- Vincent F., Gralka M., Schleyer G., Schatz D., Cabre-Brufau M., Kuhlisch C., Sichert A., Vidal-Melgosa S., Mayers K., Barak-Gavish N., Flores J. M., Masdeu-Navarro M., Egge J. K., Larsen A., Hehemann J.-H., Marrasé C., Simó R., Cordero O. X., and Vardi A. Viral infection switches the balance between bacterial and eukaryotic recyclers of organic matter during coccolithophore blooms. *Nature Commun.*, **14** (1), 510 (2023). DOI: 10.1038/s41467-023-36049-3
- Токарев Ю. Н., Финенко З. З. и Шадрин Н. В. Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования (ИнБИОМ, Севастополь, 2008). EDN: YWHYTB
- Горбунова С. Ю. и Тренкеншу Р. П. Опыт получения альгологически чистой культуры *Tetraselmis viridis* Rouch. в нестерильных условиях. *Вопр. соврем. альгологии*, **1** (22), 94–100 (2020). DOI: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-94-100, EDN: YMN LAP
- Das P., Thaher M. I., Hakim M. A. Q. M. A., Al-Jabri H. M. S. J., and Alghasal G. S. H. S. A comparative study of the growth of *Tetraselmis* sp. in large scale fixed depth and decreasing depth raceway ponds. *Biore-source Technol.*, **216**, 114–120 (2016). DOI: 10.1016/j.biortech.2016.05.058
- Pulz O. and Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **65** (6), 635–648 (2004). DOI: 10.1007/s00253-004-1647-x
- Griffiths M. J., van Hille R. P., and Harrison S. T. L. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.*, **24**, 989–1001 (2012). DOI: 10.1007/s10811-011-9723-y
- Kleivdal H., Chauton M. S., and Reitan K. I. *Industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA rich raw material in fish feed—Basis, knowledge status and possibilities* (SINTEF, Bergen, 2013).
- Bucher H. C., Hengstler P., Schindler C., and Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.*, **112** (4), 298–304 (2002). DOI: 10.1016/S0002-9343(01)01114-7
- Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits. *J. Nutrition*, **139** (1), 5-10 (). DOI: 10.3945/jn.108.094268
- Ulmann L., Blanckaert V., Mimouni V., Andersson M., Schoefs B., and Chénais B. Microalgal fatty acids and their implication in health and disease. *Mini Rev. Med. Chem.*, **17** (12), 1112–1123 (2017). DOI: 10.2174/1389557516666160722132736
- Stepanova O. A. Black Sea algal viruses. *Russ. J. Mar. Biol.*, **42** (2), 123–127 (2016). DOI: 10.1134/S1063074016020103
- Stepanova O. A., Boiko A. L., and Shcherbatenko I. S. Computational genome analysis of three marine algoviruses. *Mikrobiol. Zhurn.*, **75** (5), 76–81 (2013).
- <https://solinstruments.by/produkcija/spektrofotometri/mc-122/dopolnitelnoe-oborudovanie/>
- Тренкеншу Р. П. и Лелеков А. С., *Моделирование роста микроводорослей в культуре* (ООО «Константа», Белгород, 2017). EDN: XTJPCN
- Новикова Т. М. Влияние средней поверхностной освещенности на ростовые характеристики *Tetraselmis viridis*. *Вопр. соврем. альгологии*, № 1 (13) (2017). EDN ZCDLNP.
- Чернышев Д. Н., Горбунова С. Ю. и Тренкеншу Р. П. Разделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов. *Актуал. вопр. биол. физики и химии*, **5** (2), 232–238 (2020). EDN: UVYKFN
- Simis S. G. H., Tjidsens M., Hoogveld H. L., and Gons H. J. Optical changes associated with cyanobacterial bloom termination by viral lysis. *J. Plankton Res.*, **27** (9), 937–949 (2005). DOI: 10.1093/plankt/fbi068, EDN: IYRQHR

Effects of Viral Lysis on Light Absorption Properties of Black Sea Microalgae *Tetraselmis viridis*

S.A. Sholar* and O.A. Stepanova**

*Federal Research Center «Marine Hydrophysical Institute of the Russian Academy of Sciences»,
Kapitanskaya ul. 2, Sevastopol, 299011 Russia

**Institute of Natural and Technical Systems, Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 28, Sevastopol, 299011 Russia

Spectrophotometry was used to investigate the effects of viral lysis on the absorbance properties of microalgal culture *Tetraselmis viridis* inoculated with virus, and compare them to control (growth of control culture of the microalgal culture without inoculated virus). Some peculiarities of methodological approach to conducting multi-day experiments were brought to attention, taking into the natural titers of algal viruses, equal volumes of the marine microbiota (algal viruses or nutrient medium, microalgal cultures) and conditions (temperature, illumination) in the experiment and control, preventing possible viral contamination of microalgae in the control. It has been established that in the dynamics of experiments during the destruction (lysis) of viral hosts (microalgae cells), an increase in the amount of dissolved organic material is observed.

Keywords: *Tetraselmis viridis*, light absorption, spectrophotometry, integrating sphere, marine algal viruses, microbiota