

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА РАЗВИТИЕ ЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛИ *TETRASELMIS VIRIDIS* В КУЛЬТУРЕ

Л.В. Стельмах¹, О.А. Степанова²

¹ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН»,
РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

E-mail: lustelm@mail.ru

²Институт природно-технических систем, РФ, г. Севастополь, ул. Ленина, 28

E-mail: solar-ua@ya.ru

Экспериментальное изучение контакта альгологически чистой культуры морской микроводоросли *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) с альговирусом (штамм TsV-S1) показало, что в условиях непрерывного искусственного освещения вирусное инфицирование клеток водорослей при интенсивности света $60 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ отмечалось через сутки после заражения культуры, а при $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – через двое суток. Инфицированные и неинфицированные клетки отличались по форме и размерам. Начало отмирания инфицированной культуры при $60 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ наблюдалось в конце третьих суток, после того как численность клеток достигла $3 \cdot 10^5 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$, при $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – в начале пятых суток при такой же численности. Полный лизис водорослей выявлен к концу шестых суток в условиях низкой интенсивности света, а ее увеличение в 3 раза вызвало сокращение этого процесса на двое суток.

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

Поступила в редакцию: 11.01.2019. После доработки: 11.03.2019.

Введение. Фитопланктон, являясь первичным звеном морских экосистем, определяет судьбу всех последующих трофических уровней, оказывает существенное влияние на биогеохимические циклы углерода, азота, фосфора, кремния и других элементов, а также на многие другие процессы, происходящие в море. Основная причина периодической гибели фитопланктонных клеток связана с их потреблением микро- и мезозоопланктоном. Показано, что в глобальном масштабе микрзоопланктон в среднем за год консультирует 60–75%, а мезозоопланктон – 12% углерода первичной продукции фитопланктона. При этом другие потери первичной продукции за счет вертикального экспорта водорослей и их вирусного лизиса составляют остальную небольшую долю общей продукции фитопланктона [1]. По данным исследователей, вирусный лизис является основной причиной ежедневной гибели около 3–5% клеток фитопланктона [2]. Вместе с тем в отдельные периоды влияние вирусов на фитопланктон может возрастать. Как считает ряд исследователей [3–5], быстрое прекращение «цве-

тения воды», вызываемое отдельными видами водорослей, может происходить в результате высокой численности вирусов в зонах «цветений» и, как следствие этого, вирусного лизиса растительных клеток. Многие вопросы относительно контакта вирусов и их одноклеточных хозяев в гидросфере объясняет концептуальная модель вирусного контроля численности и разнообразия хозяина [2]. Однако изучение этого контакта в естественных условиях (в море) развивается довольно медленно, так как осложняется рядом методических и методологических трудностей [6].

В качестве методологической основы для выявления роли вирусов в функционировании фитопланктона и судьбе его первичной продукции могут служить лабораторные эксперименты по взаимодействию альговирусов с их хозяевами – культурами микроводорослей. Такие эксперименты позволяют выявить наиболее благоприятные условия для инфицирования водорослей вирусами, определить скорость разрушения клеток в результате их лизиса под влиянием вирусной инфекции, а также время, необ-

ходимое для полного вирусного лизиса. Несмотря на быстрое развитие исследований в этом направлении в последние годы [7–9], не ясно, какие абиотические условия наиболее благоприятны для процесса вирусного лизиса планктонных водорослей. Кроме того, на культурах микроводорослей, выделенных из планктона Черного моря, до настоящего времени исследования такого рода не проводились.

Цель настоящей работы состояла в оценке влияния вирусной инфекции на рост и деструкцию (разрушение, лизис) черноморской микроводоросли *Tetraselmis viridis* в культуре при разных световых условиях.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования была использована альгологически чистая культура микроводоросли *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara (Chlorophyta), выделенная из планктона Черного моря и содержащаяся в коллекции отдела экологической физиологии водорослей ИМБИ РАН. Клетки этой водоросли имеют форму эллипсоида, длина которого составляет 10–14 мкм, а ширина – 5–10 мкм. Средний объем клеток равен 260 ± 40 мкм³. До начала эксперимента культуру адаптировали к двум интенсивностям непрерывного света в течение трех суток. Первая интенсивность составляла 20 мкЭ·м⁻²·с⁻¹, при которой рост данного вида был лимитирован. Вторая интенсивность света достигала 60 мкЭ·м⁻²·с⁻¹, что обеспечивало максимальную скорость роста *T. viridis*. Каждую из двух адаптированных культур делили на три части. По 50 мл культуры помещали в конические колбы объемом 150 мл. В первую контрольную колбу вносили 50 мл стерильной морской воды с питательной средой f/2. Во вторую и третью опытные колбы добавляли по 50 мл вирусной суспензии при титре 10^7 вирионов/мл.

Вирусная суспензия альговируса (штамм TsV-S1) до начала опыта хранилась при -20°C . Для активации вирусов в размороженную суспензию вносили культуру *T. viridis* (1:1 по объему) в логарифмической стадии роста и экспонировали на рассеянном свете при темпе-

ратуре 18°C в течение 10 дней. После завершения вирусного лизиса культуры и установления титра вирусной суспензии в пределах 10^7 вирионов в 1 мл проводили очистку последней путем предварительного центрифугирования при скорости 3000 оборотов в минуту в течение 10 мин. Затем вирусную суспензию пропускали через трековую мембрану с диаметром пор 0,2 мкм. Таким образом, была получена чистая вирусная суспензия штамма TsV-S1, которую использовали в экспериментах.

Штамм TsV-S1 альговируса микроводоросли *T. viridis* был изолирован из межстворчатой (мантийной) жидкости черноморской мидии в 2002 г. [10] по авторской запатентованной методике [11], которая лежит и в основе определения вирусного титра путем десятикратных разведений, что кратко изложено в [12]. Методом электронной микроскопии ранее установлено, что TsV-S1 имеет форму икосаэдра с диаметром 56–60 нм. На основании результатов изучения штаммов альговируса микроводоросли *T. viridis*, в т.ч. и генетического анализа, они были отнесены к семейству Phycodnaviridae [10, 12, 13].

По одной контрольной колбе и по две опытных помещали на световую решетку. Освещение колб осуществляли снизу с помощью светодиодов. Определенные интенсивности света создавали за счет сетчатых светофильтров, помещенных между колбами и светодиодами. Освещенность измеряли с помощью люксметра Ю-116. Коэффициент перехода от освещенности в люксах к интенсивности света составлял 10^4 лк = 170 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ [14]. Температура воды в опытных склянках была оптимальной для развития данного вида водорослей и составляла 18°C .

В ходе эксперимента отбор проб из колб выполняли только в светлое время суток. В течение 1–3-х суток пробы отбирали в 9:00, 13:00 и 17:00 часов, а на 4–6-е сутки – в 9:00 и 17:00 часов. Для учета численности клеток и их фотографирования использовали световой микроскоп Микромед ЗЛЮМ, оснащенный фотокамерой TourCam UCMOS 14000 КРА. Счет клеток осуществляли в трех

повторностях в счетной камере Горяева. Общее увеличение системы микроскопа в процессе счета составило 100 раз. Относительная погрешность подсчета клеток в параллельных пробах была равна 10–15%. Удельную суточную скорость роста микроводорослей рассчитывали по приросту численности клеток в пробах по уравнению

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

где μ – удельная скорость роста, сутки⁻¹; N_0 и N_t – исходная численность клеток и их количество через сутки, (кл. · мл⁻¹).

Результаты и обсуждение. Вид исходной культуры *T. viridis* представлен

на рис. 1(а) слева. Подобным образом выглядела культура этого вида в конце эксперимента в контроле, когда она достигала стационарной фазы роста. Тогда как культура, подвергнутая влиянию вирусной инфекции, в конце эксперимента была полностью лизирована, поэтому ее суспензия выглядела абсолютно прозрачной, что можно видеть на рис. 1(а), справа. Совершенно очевидно, что в результате вирусного лизиса клеток фитопланктона оптические характеристики воды изменяются, что подтверждено результатами недавно проведенных экспериментов [15].

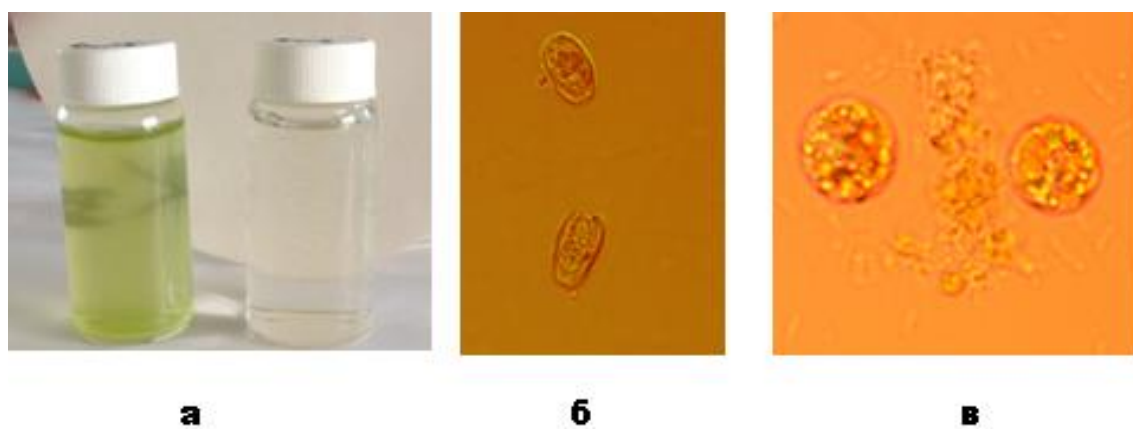


Рис. 1. Суспензия культуры *T. viridis* в контроле (а, слева) и ее вид после завершения вирусного лизиса клеток (а, справа); клетки водорослей в контрольной пробе (б) и в пробе, где отмечено начало вирусного лизиса (в)

Динамика численности клеток *T. viridis* в контрольных колбах и в опытных (с добавлением вирусной суспензии) при разных световых условиях представлена на рис. 2.

Несмотря на высокую исходную концентрацию вирусных частиц в экспериментальных колбах скорость заражения клеток исследуемого вида водорослей зависела от световых условий. При световом лимитировании роста водорослей в течение первых четырех суток наблюдалось постепенное увеличение численности клеток как в контроле, так и в опыте (рис. 2а). При этом, численность водорослей в опытной колбе была приблизительно на 20% выше, чем в контрольной. Последнее обусловлено, вероятно, тем, что вирусная суспензия, вне-

сенная в опытную колбу, содержала органические вещества, наличие которых связано с процессом гибели клеток водорослей *T. viridis* и их разрушением в период активации вирусной суспензии (перед экспериментом). Именно поэтому за первые сутки удельная скорость роста культуры водорослей в опытной колбе в 2 раза выше, чем в контроле, составив 0,48 сутки⁻¹ (табл. 1). В период со 2-х по 4-е сутки экспозиции водорослей в условиях низкой освещенности удельная скорость роста в контрольных и опытных колбах не различалась, находясь в пределах значений 0,24–0,48 сутки⁻¹.

Важно отметить, что уже в начале третьих суток эксперимента (в 9:00) в опытных колбах наблюдались шаровидные клетки, заполненные, вероятно, ви-

рионами, тогда как в контроле клетки водорослей имели эллипсоидную форму (рис. 1б, в). Как показано ранее [16],

клетки зеленой микроводоросли *Tetraselmis striata* на завершающей фазе их инфицирования вирусами также

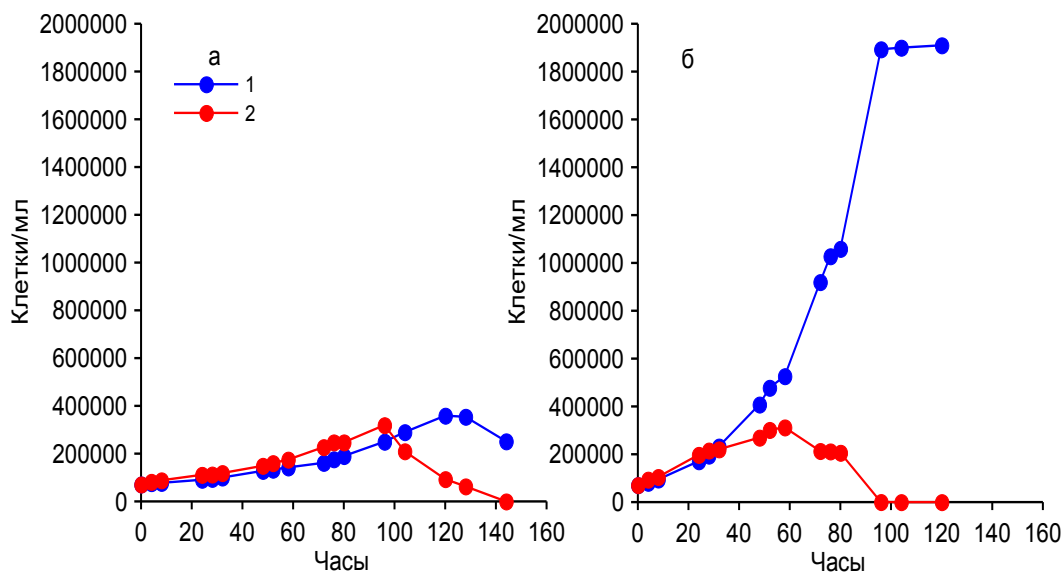


Рис. 2. Динамика численности клеток *T. viridis* в контроле (1) и в присутствии вируса (2) при лимитирующей рост культуры интенсивности света (а) и при насыщающей рост интенсивности света (б)

Таблица 1. Удельная скорость роста и отмирания клеток в культуре водорослей *T. viridis* в контроле (К) и в опыте (О) при лимитирующей рост интенсивности света (1) и при насыщающей интенсивности (2)

Сутки	μ , сутки ⁻¹			
	К ₁	О ₁	К ₂	О ₂
1	0,24±0,04	0,48±0,08	0,88±0,15	1,02±0,20
2	0,24±0,05	0,24±0,06	0,87±0,17	0,31±0,08
3	0,48±0,09	0,48±0,07	0,81±0,15	(-0,23)±(-0,06)
4	0,24±0,04	0,24±0,03	0,72±0,13	(-6,28)±(-0,28)
5	0,10±0,03	(-1,20)±(-0,32)	0	-
6	(-0,36)±(-0,07)	(-6,68)±(-0,22)	-	-

приобретали форму шара и увеличивались в объеме по сравнению с неинфицированными (здоровыми) клетками этого вида более чем в 2 раза. Использование электронной микроскопии позволило авторам зарегистрировать клетки, цитоплазма которых заполнена вирусами.

В наших исследованиях шаровидные клетки водорослей, пораженные вирусами, по объему были примерно в 4 раза крупнее, чем неинфицированные. Их число в начале третьих суток экспозиции было незначительно. Поэтому удельная

скорость роста водорослей в это время в контрольных сосудах и в колбах, где присутствовали вирусы, была одинакова. К концу четвертых суток численность клеток в опытной культуре достигла максимума – $3 \cdot 10^5$ кл.·мл⁻¹. В последующий период их количество быстро снижалось в результате разрушения под влиянием вирусов.

Удельная скорость снижения численности водорослей составила – 1,20 сутки⁻¹ на пятые сутки эксперимента, а на шестые сутки этот показатель возрос приблизительно в 5,5 раза. При этом, в

контрольной колбе численность клеток *T. viridis* продолжала нарастать в течение пятых суток, достигнув стационарной фазы роста, а на шестые сутки отмечено естественное отмирание культуры, скорость которого составила $-0,36 \text{ сутки}^{-1}$. Таким образом, скорость отмирания клеток исследуемой культуры водорослей в результате действия вирусов существенно выше, чем в результате естественного отмирания.

При интенсивности света $60 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, обеспечивающей максимальную скорость роста *T. viridis*, в первые сутки эксперимента структурных и функциональных изменений клеток во всех колбах (опыт и контроль) не отмечено. Однако шаровидные клетки, вероятно, заполненные вирионами, были обнаружены нами в опытных колбах уже на вторые сутки эксперимента в большом количестве (почти 50% от общей численности клеток). При этом удельная скорость роста культуры в присутствии вирусов снижалась и составила лишь $0,31 \text{ сутки}^{-1}$, что в 2,8 раза ниже относительно контроля. Не случайно, что уже к концу вторых суток общая численность клеток в инфицированной культуре была почти на 30% меньше, чем в контроле и составляла $3 \cdot 10^5 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$ (рис. 2б). В течение третьих и четвертых суток эксперимента клетки *T. viridis* в контроле находились в фазе экспоненциального роста, тогда как в пораженной вирусами культуре наблюдалось их отмирание с высокой скоростью. В итоге в начале пятых суток клетки *T. viridis* в контроле достигли стационарной фазы, тогда как в опытных колбах процесс лизиса водорослей под влиянием вирусов завершился уже к концу четвертых суток. Более высокая скорость отмирания клеток была показана в исследованиях на культуре зеленой микроводоросли *Ostreococcus lucimarinus*. Так при оптимальных для роста световых условиях и исходной численности клеток этого вида, равной $1,2 \cdot 10^6 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$, полный лизис культуры наблюдался через 1–2 суток от начала ее заражения [7]. Подобные результаты были получены и для культуры *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyta), полный лизис которой отмечен к концу

вторых суток при исходной численности клеток $1 \cdot 10^6 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$ [8]. Возможно, что более высокая плотность исходной культуры может приводить к существенному ускорению процесса вирусного лизиса. Однако, по нашему мнению, необходимо учитывать также свойства и особенности самих вирусов, скорость вирусной продукции клетками микроводорослей, что может зависеть от видовой принадлежности последних.

Важную роль в этом процессе играет уровень освещенности. В наших экспериментах показано, что при увеличении интенсивности света от 20 до $60 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ время наступления полного лизиса культуры *T. viridis* сокращается в 1,5 раза. При низкой интенсивности света, лимитирующей рост водорослей данного вида, полный лизис культуры наблюдался к концу шестых суток от начала заражения вирусом. Тогда как при интенсивности света, обеспечивающей максимальную скорость роста водорослей, их полный лизис наблюдался двумя сутками раньше. Следует отметить, что независимо от световых условий, начало деструкции культуры микроводорослей *T. viridis* вследствие вирусного лизиса наблюдалось при одинаковой численности её клеток ($3 \cdot 10^5 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$), которую условно можно назвать критической (пороговой) для данного вида водорослей и вируса TsV-S1, способного лизировать этот вид.

Заключение. Выполненные исследования по влиянию вирусной инфекции на культуру морской микроводоросли *T. viridis* (Chlorophyta) показали, что даже при высокой концентрации вирусов в экспериментальных сосудах скорость заражения ее клеток зависела от световых условий. Интенсивность света, при котором удельная скорость роста водорослей была максимальна, способствовала более быстрому увеличению численности и активности клеток-хозяев вируса TsV-S1, а, следовательно, и росту численности вирионов (вирусных частиц).

Начало вирусного инфицирования клеток *T. viridis* при интенсивности света, насыщающей рост водорослей ($60 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), отмечено через сутки после

заражения культуры. При интенсивности света, лимитирующей рост данного вида водорослей ($20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$), начало инфицирования клеток вирусами наблюдалось на сутки позже.

Инфицированные вирусом клетки водорослей отличались от неинфицированных (здоровых) по форме и размерам. Они постепенно приобретали форму шара, а их объем увеличивался приблизительно в 4 раза, тогда как форма неинфицированных клеток была близка к эллипсоиду.

Начало отмирания клеток *T. viridis* в результате вирусного лизиса при интенсивности света $60 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ отмечалось в конце третьих суток, а при $20 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ – в начале пятых суток. Независимо от световых условий, начало деградации культуры микроводорослей *T. viridis* вследствие вирусного лизиса наблюдалось после достижения численности ее клеток $3 \cdot 10^5 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$, которую условно можно назвать критической (пороговой) для данного вида водорослей и вируса TsV-S1, способного лизировать этот вид.

Полный лизис клеток водорослей выявлен к концу шестых суток в условиях слабого света, тогда как при увеличении его интенсивности в 3 раза этот процесс был завершен двумя сутками раньше.

На основе полученных результатов и данных, опубликованных в литературе по влиянию вирусной инфекции на отдельные виды водорослей в лабораторных экспериментах, можно полагать, что роль вирусной инфекции в отмирании фитопланктонных клеток в море может возрастать только в периоды «цветения воды» отдельными видами водорослей. В такие периоды численность их клеток увеличивается на несколько порядков, что вызывает сезонные пики численности альговирюсов, способных инфицировать данные виды. В этой ситуации деградация фитопланктонного «цветения» может произойти, вероятно, в течение нескольких дней.

Работа подготовлена в рамках государственного задания ИМБИ РАН № АААА-А18-118021490093-4 “Функци-

ональные, 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».

Авторы выражают искреннюю благодарность сотруднику ИМБИ РАН Солоницыной О.Р. за помощь при выполнении данной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmoker C., Hernandez-Leon S., Calbet A. Microzooplankton grazing in the oceans: impacts, data variability, knowledge gaps and future directions // Journal of Plankton Research. 2013. Vol. 35. P. 691–706.
2. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. and Molec. Biol. Reviews. 2000. Vol. 64, N 1. P. 69–114.
3. Bratbak G., Wilson W., Heldal M. Viral control of *Emiliania huxleyi* blooms? // Journal of Marine Systems. 1996. 9. 1–2. P. 75–81.
4. Viral glycosphingolipids induce lytic infection and cell death in marine phytoplankton / Vardi A., VanMooy, B.A.S., Fredricks H.F. [et al] // Science. 2009. 326. P. 861–865. DOI: 10.1126/science.1177322.
5. Decoupling physical from biological processes to assess the impact of viruses on a mesoscale algal bloom / Y. Lehahn, I. Koren, D. Schatz [et al.] // Curr. Biol. 2014. 24. P. 2041–2046. DOI: 10.1016/j.cub.2014.07.046.
6. Beckett S.J., Weitz J.S. The Effect of Strain Level Diversity on Robust Inference of Virus-Induced Mortality of Phytoplankton // Frontiers in Microbiology. 2018. 9. Article 1850. DOI: 10.3389.
7. Diversity of viruses infecting the green microalga *Ostreococcus lucimarinus*/

E. Derelle, A. Monier, R. Cooke [et al.] // J. Virol. March, 2015. DOI:10.1128.

8. *Slagter H.A., Gerringa L.J.A., Brussaard C.P.D.* Phytoplankton Virus Production Negatively Affected by Iron Limitation // *Front. Mar. Sci.* 2016.3:156. DOI: 10.3389.

9. *Takano Y., Tomaru Y., Nagasaki K.* Visualization of a Dinoflagellate-Infecting Virus HcDNAV and Its Infection Process // *Viruses.* 2018. 10. 554. DOI:10.3390.

10. *Характеристика* вируса *Tetraselmis viridis* Norris (Chlorophyta, Prasinophyceae) / О.А. Степанова, А.Л. Бойко, А.И. Гордиенко [и др.] // *Доп. НАН України.* 2005. № 1. С. 158–162.

11. *Декларационный* патент на изобретение 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів одноклітинних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta) / О.А. Степанова (UA); заявник Інститут біології південних морів ім. О.О. Ковалевського НАН України (UA). № 2003065499; заявл. 13.06.2003; опубл. 15.04.2004,

Бюл. № 4 // Промислова власність. 2004. № 4.

12. *Степанова О.А.* Черноморские альговірусы // *Биология моря* 2016. 42. № 2. С. 99–103.

13. *Степанова О.А., Бойко А.Л., Щербатенко И.С.* Компьютерный анализ геномов трех морских альговірусів // *Микробиологический журнал.* 2013. Т. 75. № 5. С. 76–81.

14. *Парсонс Т.Р. Такахаши М., Харгрейв Б.* Биологическая океанография. Москва: Лег. и пищ. промышленность, 1982. 431 с.

15. *Степанова О.А., Гайский П.В., Шоларь С.А.* Влияние вирусного лизиса на некоторые физические параметры морской воды в условиях эксперимента // *Системы контроля окружающей среды.* Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 13 (33). С. 19–28.

15. *TsV-N1: A Novel DNA Algal Virus that Infects Tetraselmis striata* / A.Pagarete, T. Grébert, O. Stepanova [et al.] // *Viruses.* 2015. 7. 3937–3953. DOI: 10.3390.

INFLUENCE OF VIRUS INFECTION ON THE GROWTH OF GREEN ALGAE *TETRASELMIS VIRIDIS* IN CULTURE

L.V. Stelmakh¹, O.A. Stepanova²

¹The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, RF, Sevastopol, Nachimov Av., 2

²Institute of Natural and Technical Systems, RF, Sevastopol, Lenin St., 28

An experimental study of the contact of algologically pure culture of the marine microalgae *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) with algal virus (strain TsV-S1) revealed that, under conditions of continuous artificial illumination, viral infection of algae cells at the light intensity of 60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ was noted a day after infection, and at 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ after two days. Infected and non-infected cells differed in shape and size. The onset of the death of the infected culture at the light intensity of 60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ was noted at the end of the third day after the number of algae cells reached $3\cdot 10^5$ cells $\cdot\text{ml}^{-1}$, whereas at 20 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ – at the beginning of the fifth day with the same number. Complete lysis of algae cells was registered by the end of the sixth day under low light conditions, while 3 times increase in light intensity resulted in completing this process two days earlier.

Key words: marine microalgae, algal virus, phytoplankton, Black Sea.