ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛАБОРАТОРНОГО СТЕНДА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВОДНОЙ СРЕДЫ В ПРИСУТСТВИИ МИКРОБИОТЫ

С.А. Шоларь¹, О.А. Степанова², Л.В. Стельмах³

¹Морской гидрофизический институт РАН, РФ, г. Севастополь, ул. Капитанская, 2
E-mail: sa.sholar@mail.ru

²Институт природно-технических систем, РФ, г. Севастополь, ул. Ленина, 28
E-mail: solar-ua@ya.ru

³Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН,
РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2
E-mail: lustelm@mail.ru

В рамках экспериментов по изучению оптических свойств водной среды в присутствии микробиоты адаптирован простой и доступный в использовании экспериментальный лабораторный стенд из двух идентичных емкостей равного объема, предназначенных для контрольных и опытных замеров оптических характеристик морской воды при помощи малогабаритного спектрального измерителя показателя ослабления света. В емкостях создаются модельные биологические системы, основу которых составляет морская вода с добавлением микробиоты, в качестве которой используют культуры микроводорослей и суспензии альговирусов. Выполненные эксперименты выявили влияние микробиоты на оптические свойства водной среды: наблюдалось повышение показателя ослабления света в результате роста культур микроводорослей (в контроле) и его снижение вследствие вирусного лизиса культур (в опыте).

Ключевые слова: экспериментальный лабораторный стенд, спектральный измеритель показателя ослабления направленного света, культуры микроводорослей, альговирусы, вирусный лизис.

Поступила в редакцию: 30.04.2019. После доработки: 15.05.2019.

Введение. Многие биологические микропроцессы в гидросфере, в конечном итоге влияющие на физические параметры среды их обитания, особенно на уровне биофизических микропроцессов, сложно изучить в природных условиях. Так в конце 20-го – начале 21-го века стремительно развивающаяся морская вирусология, названная «младенческой дисциплиной» [1], поставила перед исследователями множество новых научных проблем [1–6]. Одна из них – отсутствие знаний о роли морских вирусов в изменении физических параметров водной среды [7, 8]. В связи с этим выполнение лабораторных исследований по изучению влияния вирусного лизиса на физические характеристики водной среды, которые можно экстраполировать на процессы в природе, приобретают все большую актуальность. Особый интерес в этом направлении представляют альговирусы, вызывающие лизис представителей фитопланктона – микроводорос-

лей, роль которых в экологии гидросферы переоценить сложно [2]. Процессы роста культур микроводорослей, как и фитопланктона в целом, включая влияющие на них биотические и абиотические факторы, изучены хорошо [9–13]. Исследовано влияние вирусного лизиса на фитопланктон и на отдельные виды микроводорослей [5, 6, 14, 15]. Однако сведений о влиянии морских альговирусов и вирусного лизиса их хозяев (микроводорослей) на физические характеристики водной среды их обитания практически отсутствуют [7, 8]. Наши первые экспериментальные исследования в этом направлении установили факт изменения (снижения) электрической проводимости морской воды и прозрачности (снижения показателя ослабления света) в созданных модельных биологических системах под влиянием вирусного лизиса [16, 17]. Поскольку эти эксперименты проводили в лабораторной установке, содержащей только одну емкость, используемую для

опыта (модельная биологическая система с вирусным лизисом), возникла необходимость создания простого и доступного экспериментального лабораторного стенда с двумя емкостями. Одна из емкостей служила бы в качестве опыта, где создавалась бы модельная система роста и развития представителей фитопланктона (микроводорослей) под воздействием вирусного лизиса (опыт), а вторая – без него (контроль).

Целью выполненной работы явилось создание и апробирование простого и удобного в эксплуатации экспериментального лабораторного стенда с двумя емкостями (контроль и опыт), позволяющими получать результаты по изменению прозрачности водной среды в динамике в модельных биологических системах, основу которых составляет морская вода и микробиота (микроводоросли и альговирусы).

Материалы и методы. Для апробирования создаваемого экспериментального лабораторного стенда использовалась морская вода, культуры микроводорослей и вирусные суспензии.

Морская вода подвергалась предварительной обработке для очистки от взвеси путем фильтрации через ватно-марлевый фильтр и от представителей микробиоты с помощью пастеризации.

Используемые в экспериментах в стадии логарифмического роста культу-

ры микроводорослей *Tetraselmis viridis*, *Dunaliella tertiolecta* и *Dunaliella viridis* были получены из коллекции микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского.

В качестве альговирусов использовали вирусные суспензии альговирусов двух штаммов – к микроводоросли *T. viridis* (штамм TvV-S1) и *D. viridis* (штамм DvV-SI2) – из авторской коллекции [18].

Счет клеток микроводорослей в контроле и опыте осуществляли в трех повторностях в счетной камере Горяева. Относительная погрешность подсчета клеток в параллельных пробах была равна 10–15%.

Титр (концентрацию) альговирусов в вирусных суспензиях, а также в опыте в начале и в конце эксперимента определяли путем десятикратного разведения на основе авторского способа изоляции альговирусов [19], что также кратко описано и в [18].

Фиксирование изменения прозрачности среды в контроле и опыте проводили с использованием малогабаритного спектрального измерителя показателя ослабления направленного света (СИПО), который помещали в емкости лабораторного стенда (рис. 1).

Рис. 1. Спектральный измеритель показателя ослабления света [20]

Малогабаритный спектральный измеритель показателя ослабления направленного света (прозрачномер) разработан в отделе оптики и биофизики моря Морского гидрофизического института РАН [20] и обеспечивает измерения по-

казателя ослабления света (ПОС) в 4-х спектральных интервалах (460 нм, 520 нм, 590 нм, 625 нм).

Расчет регрессионного уравнения и статистический анализ результатов ре-

грессии выполняли с помощью программы MS Excel для Windows.

Описание созданного экспериментального лабораторного стенда и методики подготовки и проведения исследований. При создании экспериментального лабораторного стенда для проведения планируемых исследований были использованы два идентичных пластиковых сосуда (емкости из пищевого прозрачного пластика) с диаметром 28 см и высотой 30 см каждый, что позволяло размещать в них до 15 л изучаемых жидких модельных биологических систем на основе морской воды. Одна из емкостей использовалась для контроля, другая для опыта. Стенки за сосудами, слева и справа были покрыты светоотражающим материалом. Когда не проводились измерения, сосуды были накрыты пищевой пленкой для уменьшения попадания в них посторонних механических примесей (пыль, насекомые и пр.) с вентиляционными отверстиями для естественного воздухообмена.

Апробирование созданного экспериментального лабораторного стенда было проведено в трех исследованиях, в которых для создания модельных биологических систем использовали монокультуры *T. viridis* и *D. viridis*. В одном из экспериментов использовали смесь культур микроводорослей *T. viridis* и *D. tertiolecta*. Альговирус к *D. tertiolecta* отсутствует в нашей коллекции, т.к. еще не был выделен.

Первоначально в контрольную и опытную емкость заливали равные объемы пастеризованной морской воды (по 10–12 л). Затем, после измерения ПОС морской воды в каждую емкость добавляли монокультуру микроводоросли или смесь культур микроводорослей (по 0,5–1,0 л).

Далее в емкость опыта добавляли альговирус в виде вирусной суспензии, соответствующей используемой в эксперименте микроводоросли, и равное по объему количество пастеризованной морской воды в емкость контроля.

Для измерения значений ПОС прозрачномер попеременно опускали в контроль и опыт экспериментального лабораторного стенда. Первоначально пред-

полагалось постоянное измерение ПОС, что выполняли в предыдущих экспериментах с использованием лабораторной установки с одной опытной емкостью [17]. Однако на иллюминаторах измерителей оседал осадочный материал, что приводило к значительному искажению результатов. Поэтому в дальнейшем для расчетов стали использовать только осредненное значение ПОС, получаемое после очищения объектива в первые 5 мин после опускания прозрачномера в изучаемую среду.

Измерения ПОС проводили в утренние часы (в 8–10 ч) и в вечернее время (15–17 ч). Для исключения загрязнения альговирусами прибор после извлечения из емкости опыта и перед последующим опусканием в емкость контроля промывали в проточной воде и не менее 30 мин выдерживали в пресной воде. Эти действия в конечном итоге приводили к значительному снижению концентрации альговирусов (промывание в пресной проточной воде), а также к их разрушению (при 30 минутном пребывании прибора в пресной воде).

Для подсчета численности клеток микроводорослей в динамике эксперимента в опыте и контроле ежедневно из опытной и контрольной емкостей в утреннее время (8–10 ч, после измерения ПОС) отбирали пробы по 20 мл в стерильные флаконы и фиксировали раствором формалина (до 1% конечной концентрации).

Для создания оптимальных условий роста культур лабораторный стенд был оснащен панелью с источником искусственного освещения, расположенной перед экспериментальными емкостями. В качестве источника освещения использовали светодиодную лампу ЕСО А60 шар 11Вт 230В 4000К Е27 ИЕК. Освещенность у передней и задней поверхностей емкостей измеряли с помощью люксметра Ю-116. Она составляла 4000 и 2000 лк соответственно, создавая освещенность, благоприятную для роста и развития используемых в эксперименте микроводорослей. Созданный экспериментальный лабораторный стенд в виде схемы представлен на рис. 2.

1 – источник искусственного освещения (светодиодная лампа ЕСО А60 шар 11Вт 230В 4000К Е27 IEK); 2 – рабочая зона, где размещается прозрачномер и датчик температуры; 3 – контрольная емкость (модель биологической системы без альговирусов); 4 – емкость для опыта (модель биологической системы с альговирусом); 5 – аквариумные насосы для перемешивания содержимого; 6 – светоотражающая поверхность; 7 – блок регулировки интенсивности работы насосов и передачи данных на ПК

Рис. 2. Схема экспериментального лабораторного стенда для изучения изменения оптических свойств водной среды под влиянием микробиоты и вирусного лизиса

Результаты апробации экспериментального лабораторного стенда. В ходе проводимых исследований с использованием культур отдельных видов микроводорослей или смешанных культур, а также вирусных суспензий альговирусов были получены данные, устанавливающие влияние вирусного лизиса, который подтверждали ростом титра вируса в конце эксперимента на 2 порядка, на оптические характеристики водной среды. Некоторые из этих данных отражены в нашем сообщении в виде рисунков-графиков (рис. 3–5), где по вертикали отмечены значения ПОС, а по горизонтали – даты в ходе эксперимента.

На рис. 3 представлены изменения значений ПОС в контроле и опыте при использовании монокультуры микроводоросли *T. viridis* с добавлением в опыт вирусной суспензии альговируса

этой микроводоросли (штамм TvV-S1). На рис. 4 отражены изменения значений ПОС в ходе эксперимента со смешанными культурами микроводорослей *T. viridis* и *D. tertiolecta* с добавлением в опыт вирусной суспензии альговируса микроводоросли *T. viridis* (штамм TvV-S1). На рис. 5 в виде графических линий представлены изменения ПОС в эксперименте с использованием культуры микроводоросли *D. viridis* и вирусной суспензии альговируса этой микроводоросли (штамм DvV-S11) в опыте. Если в начале эксперимента на рис. 5 наблюдается повышение значений ПОС в опыте по сравнению с контролем, что вероятно связано с наличием инфицированных вирусом, но еще не лизированных клеток, то уже через несколько дней картина меняется – ПОС в опыте почти в 5 раз ниже, чем в контроле.

Рис. 3. Изменение показателя ослабления света в смеси морской воды и культуры *T. viridis* с добавлением вирусной суспензии (опыт), и без нее (контроль)

Рис. 4. Изменение показателя ослабления света в смеси морской воды и культур *T. viridis* и *D. tertiolecta* с добавлением вирусной суспензии (опыт), и без нее (контроль)

Рис. 5. Изменение показателя ослабления света в смеси морской воды и культуры *D. viridis* с добавлением вирусной суспензии (опыт), и без нее (контроль)

Результаты, полученные при эксперименте со смешанными культурами микроводорослей *T. viridis* и *D. tertiolecta* с добавлением в опыт вирусной суспензии альговируса микроводорослей *T. viridis* (штамм TvV-S1), отраженные на рис. 4, отличаются от представленных на рис. 3 и, особенно, на рис. 5 данных по значениям ПОС и по времени проявления вирусного лизиса. Не вдаваясь в подробности вероятных биологических и биофизических микропроцессов этого более сложного, по сравнению с двумя другими, эксперимента, можно констатировать, что вирусный лизис, в т.ч. хотя бы одного из двух и более видов микроводорослей, приводит к повышению прозрачности водной среды (снижению ПОС). По нашему мнению, установленный факт влияния на прозрачность водной среды вирусного лизиса хотя бы к одному из видов, используемых в эксперименте микроводорослей, при экстраполяции в природные условия гидросфе-

ры может частично объяснять наблюдаемые аномалии оптических свойств воды в различных океанических регионах, что является дополнением к выдвигаемым учеными предположениям и объяснениям [21].

В ходе выполняемых экспериментов проводилось определение численности клеток микроводорослей в контроле (рост и развитие культур микроводорослей без вирусного лизиса) и в опыте (с добавлением вирусов), что в качестве примера одного из исследований представлено на рис. 6. Между числом клеток микроводорослей и величинами ПОС, как в контроле, так и в опыте со смешанными культурами микроводорослей *T. viridis* и *D. tertiolecta* с добавлением в опыт вирусной суспензии альговируса микроводоросли *T. viridis* (штамм TvV-S1) наблюдалась тесная связь, описанная линейным регрессионным уравнением с высоким коэффициентом детерминации.

Рис. 6. Зависимость показателя ослабления света от численности клеток микроводорослей в контроле (а) и в опыте (б) со смешанными культурами микроводорослей *T. viridis* и *D. tertiolecta* с добавлением в опыт вирусной суспензии

Закключение. В ходе выполненной работы был создан и апробирован экспериментальный лабораторный стенд для изучения изменения оптических характеристик водной среды под воздействием микробиоты (микроводоросли и альговирусы) и биофизических микропроцессов, происходящих, в том числе и при вирусном лизисе.

В отличие от существующих аналогов [22], используемых только для изучения роста и развития культур микроводорослей, для описанного экспериментального лабораторного стенда характерны следующие положительные черты:

- простота конструкции и доступность комплектующих деталей;
- удобство в эксплуатации и результативность полученных данных;
- наличие двух емкостей с относительно большим объемом, что предоставляет возможность одновременного применения лабораторного стенда с другими оптическими приборами.

С помощью данного экспериментального лабораторного стенда с использованием биологических составляющих (культур микроводорослей и альговирусов) было установлено следующее:

- отмечено снижение прозрачности морской воды после добавления культур микроводорослей в контроле (модель цветения фитопланктона), а также в опыте в начале эксперимента;
- выявлена динамика изменения (увеличения) прозрачности морской воды после добавления альговирусов в опыт, что отражает влияние вирусного лизиса на численность клеток хозяина (снижение числа клеток микроводорослей) и прозрачность морской воды (величина обратная ПОС) в опыте по сравнению с величинами ПОС в контроле, что отражает увеличение числа клеток микроводорослей без вирусного лизиса;
- отмечена тесная связь между численностью клеток микроводорослей и показателем ослабления света на длине волны 625 нм, как в контроле, так и в опыте.

Планируются дальнейшие исследования в данном междисциплинарном научном направлении с использованием созданного экспериментального лабораторного стенда.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № 0827-2019-0002 МГИ РАН; по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2019-0003 "Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод"; и по теме госзадания ИМБИ РАН № АААА-А18-118021490093-4 "Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Holmes R. Who rules the waves? // New Sci. 1996. 152, N 2054. Suppl. P. 8–9.
2. Лихошвай Е.В. В каждой капле воды – вирусы. Наука из первых рук. Ноябрь. 2016. № 4 (70). С. 88–94. <https://scfh.ru/files/iblock/d7a/d7acfec64738d9535246d10cc486b6e2.pdf> (дата обращения: 01.05.19).
3. Яковенко М.Л. Вирусы – новый фактор в экологии моря. Журнал «Биология». Издательский дом «Первое сентября». 2000. № 8 (543) и № 9 (544). https://bio.1september.ru/view_article.php?ID=200000801 (дата обращения: 01.05.19).
4. Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // Nature Reviews Microbiology. 2007. N 5. P. 801–812.
5. Proposal for SCOR WG to Investigate the Role of Viruses in Marine Ecosystems // Proceedings of the Scientific Committee on Oceanic Research (Venice, Italy, Sept. 2004). Baltimore (USA), 2005. Vol. 40. P. 66–70. (Annex 4).
6. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. and Molec. Biol. Reviews. 2000. Vol. 64, N 1. P. 69–114.
7. Степанова О.А. Ответные реакции вирусов гидросферы и их одноклеточных хозяев на экологические факторы // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 12 (32). С. 99–108.
8. Шоларь С.А., Ли М.Е. Оптические контактные методы мониторинга гидросферы и их возможное использование в новых исследованиях // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 4 (34). С. 19–30.
9. Стельмах Л.В. Сезонная изменчивость удельной скорости роста фитопланктона в прибрежных водах Черного моря // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 1 (31). С. 101–109.
10. Стельмах Л.В. Эколого-физиологические основы развития весеннего "цветения воды" кокколитофоридой *Emiliania huxleyi* в Черном море // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 3 (33). С. 85–92.
11. Мансурова И.М. Влияние света на удельную скорость роста динофитовых водорослей Чёрного моря // Морск. экол. журн. 2013. Т. 12. С. 73–78.
12. 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
13. Тренкениш Р.П., Лелеков А.С., Гаврилов П.Е., Набойщиков В.С. Математическая модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2016. № 1-1. С. 77–82.
14. Ecology of marine viruses – Banyuls-sur-mer, 19–22 March 2003. Monaco. 2003. 94 p. (CIESM Workshop Monographs; No 21).
15. Manual of aquatic viral ecology. Limnology and Oceanography e-Books. 2010, by the American Society of Limnology and Oceanography. Chapter 1–19. 201p. <https://aslo.org/page/manual-of-aquatic-viral-ecology> (дата обращения: 01.05.19).
16. Степанова О.А., Гайский П.В. Динамика изменений электрической

проводимости морской воды под влиянием биотической составляющей в условиях эксперимента // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. Вып. 11 (31). С. 48–56.

17. 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.

18. Степанова О.А. Черноморские альговирuses // Биология моря. 2016. Т. 42, № 2. С. 99–103.

19. Декларационный патент на изобретение 65864A UA, MKU 7 C12 N 1/12. Спосіб ізоляції альговірусів однокітинних водоростей, наприклад *Platymonas viridis* Rouch (*Chlorophyta*) / 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, Бюл. № 4 // Промислова власність. 2004. № 4.

20. Латушкин А.А. Многоканальный измеритель коэффициента ослабления света для проведения океанографических подспутниковых исследований // Управление и мехатронные системы. Севастополь: МГИ НАН Украины. 2013. С. 231–236.

21. *Bio-optical anomalies in the world's oceans: An investigation on the diffuse attenuation coefficients for downward irradiance derived from biogeochemical Argo float measurements* / E. Organelli, H. Claustre, A. Bricaud [et al.] // *Journal of Geophysical Research: Oceans*. 2017. Vol. 122. Iss. 5. P. 3543–3564.

22. Тренкениш П.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей [Электронный ресурс] // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1 (13). Режим доступа: <http://algology.ru/1097> (дата обращения 01.05.2019).

THE USE OF EXPERIMENTAL LABORATORY STAND FOR THE STUDY OF OPTICAL PROPERTIES OF THE AQUATIC MEDIUM IN THE PRESENCE OF MICROBIOTA

S.A. Sholar¹, O.A. Stepanova², L.V. Stelmach³

¹Marine Hydrophysical Institute of RAS, RF, Sevastopol, Kapitanskaya St., 2

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

³The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, RF, Sevastopol, Nachimov Av., 2

As a part of experiments to study optical properties of the aquatic environment in the presence of microbiota a simple and easy-to-use experimental laboratory stand, which consists of two identical tanks of equal volume, intended for control and test measurements using a small-size spectral light attenuation meter was adapted. In tanks, model biological systems are created, the basis of which is sea water with the addition of microbiota, which use microalgae cultures and algal viral suspensions. The experiments performed revealed the influence of microbiota on the optical properties of the aquatic environment: an increase in the attenuation of light as a result of the growth of microalgae cultures (in control) and its decrease due to viral culture lysis (in the experiment).

Keywords: laboratory stand, small-size multi-spectral light beam attenuation meter, microalgae culture, algal viruses, viral lysis.