МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ, ИЗОЛЯЦИИ И ИЗУЧЕНИЮ ЧЕРНОМОРСКИХ АЛЬГОВИРУСОВ

О.А. Степанова¹, П.В. Гайский¹, С.А. Шоларь²

¹Институт природно-технических систем, РФ, г. Севастополь, ул. Ленина, 28

E-mail: solar-ua@ya.ru

²Морской гидрофизический институт РАН, РФ, г. Севастополь, ул. Капитанская, 2

E-mail: sa.sholar@mail.ru

Обзор имеющейся литературы по методикам поиска, изоляции и изучения черноморских альговирусов с 2002 г. установил, что помимо классических были использованы усовершенствованные и/или разработанные авторские методики, что позволило выделить как новые для науки, так и для экосистемы Черного моря альговирусы и расширить знания по экологии водных вирусов. В ряде случаев этому способствовали впервые изучаемые пробы (клинический материал и материал от гидробионтов) и модельные эксперименты, в ходе которых были разработаны уникальная лабораторная установка и стенд для изучения влияния вирусов и вирусного лизиса на физические параметры среды их обитания. Мониторинг альговирусов предложено использовать как составляющую экомониторинга в качестве экологического индикатора, альговирусы – как биологические индикаторы и/или маркеры.

Ключевые слова: методы и способы изучения биологии и экологии альговирусов, микроводоросли, Черное море, лабораторная установка, лабораторный стенд, вирусный лизис.

Поступила в редакцию: 25.03.2019. После доработки: 14.08.2019.

Введение. Вирусы гидросферы – самые многочисленные и наименее изученные среди гидробионтов. По мнению ученых они играют ключевую роль не только в водной, но и в глобальной экосистеме [1–4]. При этом особый интерес у исследователей вызывают альговирусы, основными хозяевами которых являются микроводоросли – первичные продуценты органической материи, составляющие основу фитопланктона, ответственного за циркуляцию углекислого газа и кислорода, как в гидросфере, так и в атмосфере. В настоящее время описано 65 вирусов эукариотических водорослей, сохраняемых в коллекциях [5].

Первые работы по изоляции и изучению морских вирусов из экосистемы Черного моря были проведены нашими соотечественниками еще в середине 20-го века с использованием метода негативных колоний на газонах индикаторных микроорганизмов [6, 7]. Наши исследования по экологии и биологии черноморских вирусов с использованием как классических, так и усовершенствованных и самостоятельно

разработанных методик проводятся с конца 20-го века [8–10]. С 2002 г. основной акцент выполняемых работ направлен на поиск, изоляцию и изучение черноморских альговирусов. До 2014 г. исследования проводились на базе Института биологии южных морей (г. Севастополь) – ИнБЮМ, далее работа в этом направлении была продолжена в Институте природно-технических систем. В итоге выполненных исследований были выделены и изучены как новые для науки, так и для экосистемы Черного моря альговирусы [11–13]. Результаты изучения нуклеотидного состава геномов черноморских альговирусов, в соответствии с международной программой по проекту «Marine Phage, Virus & Virome Sequencing Project» (Broad Institute, MIT, USA) представлены на международном уровне в NCBI и CAMERA, а первая информация об этом опубликована в журнале [14].

Поиск, изоляция и изучение биологии и экологии вирусов гидросферы, в т.ч. их мониторинг и использование в различных модельных экспериментах по установлению

влияния на них биотических и абиотических факторов и их (вирусов и вирусного лизиса) роли в изменении физических параметров водной среды не теряют своей актуальности. И в первую очередь такой исследовательский интерес направлен на альгoviрусы, что связано с их экологической значимостью, широтой географического распространения и биоразнообразия их хозяев, и с другими проблемами, в т.ч. с возможной ролью альгoviрусов в патологии человека [15, 16].

С учетом актуальности проблем морской (водной) вирусологии и недостаточно активным ее развитием на территории нашей страны цель сообщения – представить краткую информацию о методических подходах к поиску, изоляции и изучению черноморских альгoviрусов, в т.ч. на уровне модельных экспериментов.

Поиск и изоляция черноморских альгoviрусов. В основе выделения альгoviрусов из проб, отобранных из черноморской среды, лежит известное свойство вирусов вызывать лизис своих одноклеточных хозяев (культур бактерий или микроводорослей), что приводит к повышению прозрачности и изменению цветности жидкой среды, где происходит контакт вирусов и их хозяев. Это свойство было использовано при создании простых и доступных авторских способов изоляции альгoviрусов черноморских микроводорослей [17, 18].

Пробы для изоляции черноморских альгoviрусов. Изоляцию альгoviрусов начинают с отбора и подготовки к исследованию проб, которыми являются небольшие объемы исследуемого в основном полевого и крайне редко в силу недоступности клинического материала. В качестве полевого материала изучали пробы воды, донных осадков и материала от гидробионтов (мидий и рыб), что подробно описано в [19–21]. В качестве клинического материала были изучены пробы (выделения) от людей, заболевших после пребывания на черноморских курортах. Это позволило впервые изолировать альгoviрусы из клинического материала и подтвердить высказанную ранее гипотезу о циркуля-

ции вирусов между сушей и гидросферой [15].

Материал от мидий изучали в виде мантийной (межстворчатой) жидкости в объеме $\leq 2,0$ мл. Обычно для изоляции альгoviрусов использовали 0,5–1,0 мл мантийной жидкости, в связи с высокой концентрацией вирусов в этом материале [20].

Материалом от рыб служили 10–30% суспензии (на морской стерильной воде или среде Гольдберга) из жабр [19, 21].

Пробы донных отложений (грунтов) использовали в объеме 1,0 мл в виде надосадочной жидкости 10% болтушки, приготовленной на морской стерильной воде или среде Гольдберга. Ранее было установлено, что численность вирусов в донных отложениях на порядки выше, чем в фемтопланктоне [10, 19].

Пробы морской воды для изоляции альгoviрусов использовали без предварительной обработки.

Способ изоляции альгoviрусов. Поскольку пробы морской воды являются основным и самым доступным для исследования полевым материалом, для них и излагается краткое описание запатентованной авторской методики [17]. Описываемый способ изоляции альгoviрусов при использовании иных проб отличается предварительной обработкой (приготовление суспензий, болтушек, отстаивание, центрифугирование), смысл которой заключается в освобождении материала от примесей (биологических, механических и др.) и высвобождении вирусов (из клеток биологических тканей и др.).

Для изоляции альгoviрусов использовали бактериологические лабораторные пробирки, куда пипеткой наливали 2,0 мл из исследуемой пробы морской воды и 2,0 мл жидкой культуры микроводоросли в логарифмической стадии роста в стабилизирующей среде Гольдберга – опыт. В контроле к 2,0 мл культуры микроводоросли добавляли 2,0 мл пастеризованной или стерильной морской воды.

Жидкие культуры используемых микроводорослей получали из отдела экологической физиологии водорослей ИИБЮМ.

Наблюдения проводили до 20 дней, однако изменения, в случае наличия в пробе воды искомого альговируса, проявляются уже через 5–10 дней в виде снижения или исчезновения цвета и повышения прозрачности (рис. 1).

Рис. 1. Визуально наблюдаемое различие по цвету и прозрачности между контролем – рост и развитие культуры используемой микроводоросли (слева) и опытом (справа) – вирусный лизис культуры микроводоросли

Цвет и мутность усиливаются в контроле за счет увеличения числа клеток растущей и развивающейся культуры микроводоросли. В опыте, в случае наличия в пробе морской воды альговируса к используемой микроводоросли и возникающего при этом вирусного лизиса, визуально наблюдаются снижение цвета и мутности с повышением прозрачности. Изменения, происходящие в инфицированной вирусом культуре на фоне ее контрольного роста и развития, описаны в [19, 22]. Далее прозрачную жидкость из опыта используют для последующих пассажей с установлением стабильного инкубационного (латентного) периода, а также накопления вируса и его титрования.

В итоге проведенных исследований различных проб полевого и клинического материала за период 2002–2019 гг. были изолированы новые для науки альговирусы морских микроводорослей: *Tetraselmis viridis* (TvV), *Dunaliella viridis* (DvV), *Phaeodactylum tricornutum* (PtV), *Prorocentrum pusillum* (PpV), *Isochrysis galbana* (IgV) и *Tisochrysis lutea* (TlV). Также были выделены новые

для экосистемы Черного моря штаммы альговируса микроводоросли *Emiliania huxleyi* (EhV) и цианофага цианобактерии *Synechococcus* (ScV). Из более одной тысячи изученных проб полевого и клинического материала было выделено свыше 300 штаммов альговирусов и цианофага [11–13, 19].

Авторский способ изоляции альговирусов как простой, доступный и легко воспроизводимый метод, был использован для мониторинга черноморских альговирусов, и в первую очередь для изучения их сезонности, а также как часть экомониторинга в бухтах Севастополя с учетом чувствительности хозяев альговирусов к экологической ситуации [11, 13, 23]. На основании полученных данных в ходе многолетних исследований по поиску и изоляции альговирусов, как биологических индикаторов, в т.ч. индикаторов своих хозяев, было предложено использовать их поиск для изучения географического распространения микроводорослей, а результаты мониторинга альговирусов, как маркеров экологического статуса, в качестве экологического индикатора [21, 23–25].

Изучение сезонности изоляции альговирусов из материала от черноморских рыб выявило, что вирусная контаминация жабр наблюдается только в холодный период при сокращении продолжительности светового дня и, по всей видимости, связана со снижением иммунологического статуса организма этих гидробионтов. Поскольку изоляция альговирусов из жабр черноморских рыб, по нашему мнению, свидетельствует о понижении их физиологического статуса, она может быть предложена в качестве теста (биомаркера) при изучении благополучия популяций представителей ихтиофауны [21].

Авторский способ изоляции является основой для титрования альговирусов, что позволяет определять концентрацию (численность) вирусов в вирусных суспензиях, а также в изучаемых пробах, например, установить сезонную численность альговирусов в пробах морской воды. Также описываемая методика была использована для изучения круга хозяев черноморских альговирусов [11],

определения вида изолята неизвестной микроводоросли в чистой культуре [26], выявления влияния ДНК и продуктов ее распада на альговирuses [27]. На основе авторского запатентованного способа проводились и некоторые модельные эксперименты [19, 20, 22, 25, 27–30].

Предварительное изучение штаммов изолированных альговирuses. В практике общей вирусологии имеется несколько простых и доступных классических методик предварительного изучения выделенных вирусных:

- определение их приблизительных размеров при фильтровании с учетом размера пор фильтров;
- установление температурной чувствительности, в т.ч. температуры их инактивации и устойчивости к замораживанию и/или нагреванию;
- выявление наличия суперкапсида по чувствительности к хлороформу.

Эти простые и доступные методики, изложенные в практических пособиях по общей вирусологии, были использованы и при изучении черноморских альговирuses, что описано в [11, 12, 19, 31].

Таким образом, используя способ изоляции альговирuses, в т.ч. для мониторинга и титрования, а также простые и доступные для мало оснащенных лабораторий методы предварительного изучения, можно получать определенную информацию о биологии и экологии выделяемых вирусных, что было сделано и для черноморских альговирuses.

В табл. 1 представлены данные, полученные в ходе предварительного изучения доступными методами нового для науки альговируса микроводоросли *T. viridis* (TvV), изолированного в 2002 г., и альговируса микроводоросли *E. huxleyi* (EhV), изолированного впервые из экосистемы Черного моря в 2014 г.

Таблица 1. Результаты предварительного изучения изолированного в 2002 г. из экосистемы Черного моря нового для науки альговируса микроводоросли *T. viridis* (TvV) и впервые изолированного из экосистемы Черного моря в 2014 г. альговируса *E. huxleyi* (EhV)

Штаммы изученных альговирuses	Чувствительность к хлороформу	Титр TvV и EhV (в инф.ед/мл)		Температурная чувствительность	Сезонность	Ультрафильтрация (от 300 до 200 нм)
		Морская вода	Вирусная суспензия			
TvV	Отсутствие суперкапсида	$\leq 10^6$	$\leq 10^{10}$	Выживание при -18°C ; инактивация при $+60^{\circ}\text{C}$	Пики титра в начале весны и осенью	Размер TvV менее 200 нм
EhV	Наличие суперкапсида	$\leq 10^2$	$\leq 10^5$	Инактивация при -18°C	Пики титра в конце весны и осенью	Размер EhV менее 200 нм

Черноморские альговирuses были изучены и в сложных классических методиках с использованием специфической аппаратуры научно оснащенных баз исследовательских учреждений городов Киева, Симферополя, Москвы, Бергена (Норвегия), Broad Institute, МТИ, (USA). Так исследования для изучения черноморских альговирuses проводили с помощью:

- классических биохимических методов (определение принадлежности нуклеиновой кислоты, электрофорез

вирусных белков), в т.ч. секвенирование вирусных нуклеиновых кислот и изучения набора нуклеотидов в генах и геномах;

- электронной микроскопии с определением морфологии вирионов (размеров и формы);
- методом проточной цитометрии;
- спектрофотометрии (спектр поглощения ультрафиолетового излучения);
- прибором Tox Y-PAM (Pulse amplitude modulation) (Walz, Germany),

который основан на мониторинге флуоресценции изучаемой биологической системы.

Полученные результаты в ходе изучения черноморских альговирусов с применением сложной аппаратуры и/или дорогостоящих классических методик описаны в [11, 14, 31], в т.ч. в авторских монографиях [19, 25, 32, 33]. На основании полученных при проведении исследований данных черноморские альговирусы были отнесены к семейству *Phycodnaviridae* [11]. Однако наличие космополитной комбинации генов у черноморских альговирусов указывает на их уникальность и свидетельствует об индивидуальных особенностях их свойств [14].

Модельные эксперименты. Влияние черноморских альговирусов и вирусного лизиса на физические параметры морской воды. Проблема значения альговирусов в экологии гидросферы не теряет своей актуальности. С учетом недостаточной изученности роли

вирусов и вирусного лизиса в изменении физических параметров водной среды их обитания, некоторые из наших экспериментов были направлены на выявление влияния вирусного лизиса на электрическую проводимость (ЭП) и прозрачность морской воды. Проводимые модельные эксперименты выполняли в лабораторной установке с одной емкостью [28, 29], а также и в недавно созданной установке с двумя емкостями и в двухемкостном экспериментальном лабораторном стенде [30, 34]. Использование двух емкостей позволяет получать результаты по динамике изменения ЭП и прозрачности морской воды в опыте (контакт культуры микроводоросли с альговирусом) и в контроле (рост и развитие культуры микроводоросли без вирусного лизиса).

На рис. 2 представлено в виде графических линий изменение ЭП морской воды в присутствии микробиоты – культуры микроводоросли *T. viridis* и суспензии альговируса TvV-S1 [28].

Рис. 2. График изменения температуры (красный цвет) и электрической проводимости (зеленый цвет) морской воды после добавления 4.10.17 г. в 11:30 культуры микроводоросли *T. viridis* и альговируса TvV-S1. Отбор пробы воды проводили 4.10.17 г. из Карантинной бухты [28]

По графикам, представленным на рис. 2, можно наблюдать снижение ЭП

морской воды на фоне повышения температуры в среде почти сразу после

добавления используемых биологических составляющих на протяжении около 24 ч (4.10.17 г. с 11:30 по 5.10.17 г. до 11:06). За этот период времени при повышении температуры среды примерно на 1⁰С происходит снижение ЭП приблизительно на 0,045 о.е.

В отношении того, что простейшие одноклеточные организмы могут влиять на состояние и величину электрической энергии в гидросфере, было известно еще в прошлом веке, что подробно описано В.В. Александровым в монографии [35] со ссылками на многочисленные источники. Автор указывает, что микроорганизмы в ходе своей жизнедеятельности, «...изменяя окислительно-восстановительный потенциал, концентрацию водородных ионов или концентрацию метаболитов..., создают условия, которые в совокупности с другими подходящими условиями могут давать электрическую энергию», что, по нашему мнению, может влиять и на ЭП морской воды. Скоплению планктонных сообществ, в т.ч. бактерио- и фитопланктона, соответствуют интенсивные аномалии градиента потенциала электрического поля, что, как уже подчеркивалось, связано с жизнедеятельностью этих водных микроорганизмов: «Скопление массы живых (и даже неживых) биообъектов, обладающих электрическим зарядом, проявляется на акватории макроскопически – в виде локального электрического эффекта» [35]. Автор обращает внимание на имеющуюся информацию о высоком внутриклеточном потенциале некоторых одноклеточных гидробионтов по отношению к внешней среде, причем в большинстве случаев он является отрицательным, варьируя по амплитуде от –10 до –120 мВ в зависимости от условий проводимых экспериментов. При этом многие сложные явления, с точки зрения В.В. Александрова, по всей вероятности, обусловлены электрической гетерогенностью клетки и ее функциональным состоянием, которое может быть спонтанным или зависеть от внешних воздействий (рН среды, наличие пищи и др.) и ответной реакции на это клеточной мембраны. Автором также

упоминается о зависимости потенциала от генотипа простейших и от адаптационного фактора.

Резюмируя сведения, полученные при ознакомлении с работой В.В. Александрова [35], можно сделать выводы о том, что помимо роли жизнедеятельности микроорганизмов в изменении электрического потенциала водной среды, значение имеет их генотип, а значит и вид, адаптационный фактор, а также их функциональное состояние. Поскольку функциональное состояние одноклеточных гидробионтов зависит и от их контакта с вирусами, что завершается последующим вирусным лизисом, логично утверждать, что вирусный лизис может влиять и на электрический потенциал водной среды их обитания. Иными словами, разрушая в результате вирусного лизиса клетки хозяина (микроводоросли), которые играют определенную роль в электрическом потенциале среды, вирусы приводят к его изменению, т.е. к снижению. Вероятно, этот факт и наблюдается в наших экспериментах [28, 29] в виде снижения ЭП морской воды в случае контакта микроводоросли и вирусной суспензии в создаваемой микромодели пика численности фитопланктона с последующим вирусным лизисом и сезонным вирусным пиком.

О возможной роли изменения химического состава водной среды под влиянием морских микроорганизмов, что в конечном итоге отразится на значениях ее ЭП, было сказано в [28]. Так ЭП нативной морской воды на протяжении нескольких дней одного из экспериментов снижалась под влиянием жизнедеятельности биологической составляющей – представителей морского микропланктона (микроводоросли, бактерии, вирусы). Этот факт, как и сведения из [35], обосновывают выдвинутую нами рекомендацию о предпочтительном измерении ЭП морской воды сразу в акватории или в первый день отбора пробы [28].

Исследователями изучены и описаны в лабораторных условиях оптические параметры жидкой среды вирусного лизиса с использованием микробиоты в

основном тихоокеанских регионов [36–39]. При этом работы были направлены на изучение процесса вирусного лизиса с учетом многих других меняющихся показателей: численности клеток, пигментов, размеров образующихся в результате вирусного лизиса органических частиц и их агрегации, меняющийся химический состав среды и пр. Обнаруженные характерные изменения, наблюдаемые в ходе вирусного лизиса в условиях эксперимента, было предложено применять для индикации вирусного лизиса в целях выявления массовой смертности одноклеточных хозяев в водоемах по данным оптического дистанционного зондирования. Тем не менее, роль вирусов и вирусного лизиса в изменении физических характеристик их водной среды обитания, и их учета в качестве активных компонентов физики и оптики гидросферы пока не рассматривалась. По нашему мнению, этот аспект является недостаточно изучен-

ным в теории и в практике физики и оптики моря. Отсутствуют сведения и о роли черноморских вирусов в изменении прозрачности морской среды.

В связи с недостаточной изученностью роли вирусного лизиса, как активного оптического компонента, в прозрачности водоемов, в т.ч. воды Черного моря, в 2018–2019 гг. были проведены модельные эксперименты с использованием черноморской микробиоты.

На рис. 3 представлены графики изменения прозрачности морской воды с использованием двухмостного экспериментального лабораторного стенда, где в опыте – культура микроводоросли *D. viridis* в контакте с вирусной суспензией соответствующего альговируса, штамма DvV-SI1, а в контроле – только культура микроводоросли *D. viridis* без вирусного лизиса. Эксперимент проведен в марте 2019 г.

Рис. 3. Изменение показателя ослабления света в смеси морской воды и культуры *D. viridis* с добавлением вирусной суспензии штамма альговируса DvV-SI1 (опыт) и без (контроль)

Прозрачность в проводимых экспериментах фиксировали при помощи малогабаритного спектрального измерителя показателя ослабления направ-

ленного света (ПОС) – СИПО [40], разработанного в отделе оптики и биофизики моря Морского гидрофизического института РАН.

Результаты эксперимента, представленного на графике и выполненного с использованием двухкомпонентного лабораторного стенда, как и в проведенных ранее экспериментах [30, 34], в т.ч. и в однокомпонентной лабораторной установке [29], свидетельствуют о влиянии вирусного лизиса на прозрачность морской воды при участии черноморской микробиоты (микроводорослей и вирусов).

Заключение. Выполненный обзор с частичным описанием методов и способов поиска, изоляции и изучения черноморских альговирусов, проводимых с 2002 г., установил, что в ходе исследований помимо классических были использованы усовершенствованные и/или разработанные методики. Это позволило выделить и описать как новые для науки, так и для экосистемы Черного моря альговирусы, а также расширить знания по экологии морских вирусов.

В ряде случаев получению новых знаний способствовало использование впервые изучаемого материала (клинический материал и материал от гидробионтов), а также модельные эксперименты, в ходе которых были разработаны уникальная лабораторная установка и экспериментальный стенд. На основании результатов поиска и изоляции из проб морской воды различных бухт Севастополя альговирусов и их анализа предложено использовать мониторинг альговирусов в качестве экологического индикатора и как составляющую экомониторинга, а альговирусы – как биологические индикаторы и/или маркеры.

Результаты экспериментального изучения вирусного лизиса с использованием созданных лабораторных установки и стенда позволили зафиксировать новые для физики и оптики моря факты на уровне биофизических процессов контакта вируса и хозяина.

Надеемся, что краткое описание методик поиска, изоляции и изучения черноморских альговирусов и полученных при этом результатов послужат примером и стимулом для активизации морской (водной) вирусологии в научных учреждениях нашей страны.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лихошвай Е.В. В каждой капле воды – вирусы // Наука из первых рук. 2016. Т. 70. № 4. С. 88–94.
2. Middelboe M., Brussaard C. Marine Viruses: Key Players in Marine Ecosystems // Viruses. 2017. Vol. 9. N 10. P. 302–308.
3. Suttle C.A. Marine viruses – major players in the global ecosystem // Nature Reviews Microbiology. 2007. N 5. P. 801–812.
4. Wommack K.E., Colwell R.R. Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64. N 1. P. 69–114.
5. Viruses of Eukaryotic Algae: Diversity, Methods for Detection, and Future Directions / S.R. Coy, E.R. Gann, H.L. Pound [et al.] // Viruses. 2018. Vol. 9. N 10. P. 487–514.
6. Крисс А.Е. Бактериофаг в глубинах моря // Морская микробиология (глубоководная). М.: Изд. АН СССР, 1959. С. 256–261.
7. Крисс А.Е., Рукина Е.А. Бактериофаг в море // Докл. АН СССР. 1947. Т. 57. № 8. С. 833–836.
8. Степанова О.А. Перспективы и проблемы изучения морских вирусов – бактериофагов // Экология моря. 2000. № 50. С. 37–40.
9. Степанова О.А. Морские бактерии и вирусы прибрежной части Крыма и Севастополя // Вестник Одесского национального университета. 2001. Т. 6. № 4. С. 290–292.
10. Степанова О.А. Морские бактерии и вирусы в воде и донных осадках бухт Севастополя // Экология. 2001. № 1. С. 61–63.
11. Степанова О.А. Черноморские альговирусы // Биология моря. 2016. Т. 42. № 2. С. 99–103.
12. Степанова О.А., Стельмах Л.В. Поиск и изоляция нового альговируса

микроводоросли *Tisochrysis lutea* из экосистемы Черного моря в бухтах Севастополя (Крымский регион) // Экосистемы. 2017. № 12 (42). С. 28–34.

13. Степанова О.А. Результаты мониторинга черноморских альговирусов в бухтах Севастополя и Крыма (2002–2018 гг.) // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2018. № 4 (34). С. 122–127.

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

15. Stepanova O.A., Solovyova Y.A., Solovyov A.V. Results of Algae Viruses Search in Human Clinical Material // Ukrainica Bioorganica Acta. 2011. N 2. P. 53–56.

16. *Chlorovirus* ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice / R.H. Yolken, J.B. Lorraine, D. Dunigan [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. Vol. 111. N 45. P. 16106–16111.

17. Степанова О.А. Способ изоляции альговирусов одноклеточных водорослей, например *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophyta) // Патент Украины № 65864. 2004. Бюл. № 4.

18. Степанова О.А. Способ изоляции альговирусов микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) из проб морской воды // Патент Украины № 97293. 2012. Бюл. № 2.

19. Степанова О.А. Экология аллохтонных и автохтонных вирусов Черного моря. Севастополь: Мир. 2004. 308 с.

20. Степанова О.А. Взаимодействие альговирусов и мидии *Mytilus galloprovincialis* Lamark. 1819 (Bivalvia: Mytilidae) в условиях эксперимента // Биология моря. 2017. Т. 43. № 2. С. 97–101.

21. Степанова О.А. Сезонность контаминации рыб альговирусами (Черное море) // Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: расширенные материалы междунар. научно-практич. конф. (Борк, 17–20 июля. 2007 г.). М.: Россельхоз. академия, 2007. С. 273–277.

22. Стельмах Л.В., Степанова О.А. Влияние вирусной инфекции на развитие зеленой водоросли *Tetraselmis viridis* в культуре // Системы контроля окружающей среды. Севастополь: ИПТС. 2019. № 2 (36). С. 93–99.

23. Степанова О.А. Мониторинг альговирусов индикаторных к экологической ситуации микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Phaeodactylum* в бухтах Севастополя (2002–2018 гг.) // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2018. Т. 4 (70). № 3. С. 174–181.

24. Степанова О.А. Результаты поиска альговирусов – отражение географического распространения микроводорослей // Экологическая, промышленная и энергетическая безопасность – 2017: сб. статей по мат. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Севастополь, 11–15 сент. 2017 г.). Севастополь: СевГУ. 2017. С. 1284–1288.

25. Степанова О.А. Отклик вирусной составляющей на факторы среды – Саарбрюккен: Lambert Academic Publishing, 2017. 82 с.

26. Степанова О.А., Галатонова О.А. Определение вида микроводоросли с использованием альговируса // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге: Материалы II Всерос. конф. (Сыктывкар, 5–9 октября 2009 г.). Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 2009. С. 33–34.

27. Stepanova O.A. Influence of a tetranucleotide, CGCG, on marine algal viruses // Ukrainica Bioorganica Acta. 2005. Vol. 2. N 1. P. 25–27.

28. 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. № 11 (31). С. 48–56.

29. Степанова О.А., Гайский П.В., Шоларь С.А. Влияние вирусного лизиса на некоторые физические параметры морской воды в условиях эксперимента // Системы контроля окружающей сре-

ды. Севастополь: ИПТС. 2018. № 13 (33). С. 19–28.

30. Шоларь С.А., Степанова О.А. Результаты изменения оптических свойств морской среды в эксперименте при моделировании микропроцесса – вирусного лизиса при контакте микроводорослей и альговирусов / Информационные системы и технологии – 2019: [Электронный ресурс] сб. материалов XXV Международной науч.-техн. конф. (Нижний Новгород, 19 апреля 2019 г.). Н. Новгород: НГТУ им. Р.Е. Алексеева, 2019. С. 901–907.

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

32. Степанова О.А. Циркуляция вирусов между сушей и гидросферой: монография – Саарбрюккен: Lambert Academic Publishing, 2012. 68 с.

33. Stepanova O. Search, isolation and study of Black sea algal viruses 2002–2013. New facts and hypotheses. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2014. 56 p.

34. Шоларь С.А., Степанова О.А., Стельмах Л.В. Использование экспериментального лабораторного стенда для изучения оптических свойств водной среды в присутствии микробиоты // Системы контроля окружающей среды.

Севастополь: ИПТС. 2019. № 2 (36). С. 13–21

35. Александров В.В. Электрофизика пресных вод. Ленинград: Гидрометеиздат. 1985. 184 с.

36. Fundamental changes in light scattering associated with infection of marine bacteria by bacteriophage / W.M. Balch, M. Jr. Vaughn, J.F. Novotny [et al.] // Limnol. Oceanogr. 2002. N 47. P. 1554–1561.

37. Optical changes associated with cyanobacterial bloom termination by viral lysis / S.G.H. Simis, M. Tjeldens, H.L. Hoogveld [et al.] // J. Plankton Res. 2005. Vol. 27. N 9. P. 937–949.

38. Optical signatures of the filamentous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* during mass viral lysis / S.G.H. Simis, M. Tjeldens, H.L. Hoogveld, H.J. Gons [et al.] // Limnol. Oceanogr. 2007. N 52. P. 184–197.

39. Variations in the optical properties of a particle suspension associated with viral infection of marine bacteria / J. Uitz, D. Stramski, A.C. Baudoux [et al.] // Limnol. Oceanogr. 2010. N 55. P. 2317–2330.

40. 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.

METHODICAL APPROACHES TO SEARCH, ISOLATION AND STUDY OF BLACK SEA ALGAL VIRUSES

O.A. Stepanova¹, P.V. Gaisky¹, S.A. Sholar²

¹Institute of Natural and Technical Systems, RF, Sevastopol, Lenin St., 28

E-mail: solar-ua@ya.ru

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

E-mail: sa.sholar@mail.ru

Review of available literature on research methods, search, isolating and studying of Black Sea algal viruses since 2002 established that, in addition to classical studies, improved and / or developed techniques were used, which allowed us to identify both algal viruses that are new for science and new for the Black Sea ecosystem and expand knowledge of the ecology of marine viruses. In some cases, this was facilitated by the first studied samples (clinical material and material from hydrobionts), and model experiments, during which a unique laboratory installation and stand were developed. It is proposed to use algal virus monitoring as an environmental indicator as an environmental monitoring component, and algal viruses as biological indicators and / or markers.

Keywords: methods for studying the biology and ecology of algal viruses, microalgae, Black Sea, universal laboratory installation, laboratory stand, viral lysis in marine physics and optics.