

Передбачуваний винахід відноситься до прикладної гідробіології і водяної вірусології і може бути використаний для ізоляції альговірусів з водой з метою подальшого вивчення, а також для непрямого підтвердження наявності у водоймах міководоростей, чутливих до альговірусів.

Міководорості водойм - важлива ланка в трофічному ланцюзі гідробіонтів. Певну роль у загибелі міководоростей відіграє вірус-наведений лізис, який призводить до 3-5% щоденної втрати їхньої чисельності. Зниження кількості фітопланктону не тільки негативно позначається на балансі органічного вуглецю в гідросфері, але і побічно впливає на підвищення вмісту CO₂ в атмосфері, підсилюючи тепличний ефект.

Морська міководорість *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita) поширена повсюдно і, звичайно, цілорічно в Чорному морі. Відома стійкість цієї водорості до впливу полутантів. Однак, практично відсутня інформація про патогенну чорноморську автохтонну мікрофлору, у т.ч. і про альговіруси міководорості *P. viridis*.

Відомий спосіб (див. Крисс А.Е. Бактеріофаг у глибинах моря / Морська мікробіологія (глибоководна) - М.: Видав-во АН СРСР, 1959, -С.258-261), заснований на принципі виділення морського бактеріофага на культурі чутливих морських бактерій. У пробірки з 3мл м'ясо-пептонного бульйону додавали 1мл води середньої проби чи 1мл суспензії середнього зразка мулу і петля відповідної 18-20-годинної бульйонної культури, що виділена з води чи мулу. Бактеріофагію спостерігали в засіяному культурою бульйоні, до якого додавали фільтрат, отриманий методом підсіву чи пасажу. Вона проявлялася у вигляді характерної аглютинації культури, чи про неї можна було судити в перші 6 годин спостережень по відсутності каламуті чи зменшенню каламуті бульйону в порівнянні з контрольною пробіркою, яку засівали тією ж культурою без додавання фільтрату. Недоліки способу полягають у тому, що він розроблений і застосовується для бактеріальних культур, а не для водоростей.

Автор винаходу використав описані А.Е. Криссом прояви взаємодії бактеріальної чутливої (індикаторної до бактеріофага) культури з передбачуваним бактеріофагом. Взаємодія бактерій і вірусів полягала в аглютинації бактеріальної культури й у просвітліній суміші культури бактерій і вірусів. Цей прояв пригнічення бактеріальної культури при взаємодії клітини і вірусу в рідкому живильному середовищі автор і поклав в основу свого способу ізоляції альговірусів з морського середовища на культурі чутливих водоростей. Автор використав культуру міководоростей у живильному середовищі Гольдберга за аналогією з бактеріальною культурою в бульйоні.

В основу винаходу «Спосіб ізоляції альговірусів одноклітинних водоростей, наприклад, *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita)» поставлена задача шляхом виявлення взаємодії чутливої (індикаторної до бактеріофага) культури міководоростей з передбачуваним бактеріофагом, забезпечення дослідників простим і надійним способом виділення альговірусів одноклітинних водоростей.

Поставлена задача досягається шляхом використання культури міководорості *P. viridis* на логарифмічній стадії, яку заражають досліджуваним матеріалом (морська вода, мантийна рідина мідій, 10%-ні водяні суспензії організмів обростання) у рівних об'ємах. Про наявність патогенних мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі судять за змінами у досліді в порівнянні з контролем. Для закріплення ефекту пригнічення розвитку проводять наступні пасажи в культуру міководоростей виявленого інгібіруючого матеріалу.

Спосіб реалізується таким чином. До 2,0мл культури міководорості (у бактеріологічній пробірці в стабілізуючому середовищі Гольдберга), що знаходиться в логарифмічній стадії додаються 2,0мл досліджуваного матеріалу (морська вода, відцентрифуговані 10хв при 2тис. об/хв мантийна рідина чи 10%-ні суспензії з обрастателів). Як контроль використовують 2,0мл культури міководорості з додаванням 2,0мл стерильної морської води чи стабілізуючого середовища Гольдберга. Дослід і контроль освітлюється природним чи штучним світлом (400-500лк). Спостереження ведеться протягом 20 днів. Наявність патогенних мікроорганізмів у досліджуваному матеріалі визначається за змінами у досліді в порівнянні з контролем. У досліді міководорості осідають на дно, що свідчить про порушення їхньої рухливості, а надосад стає прозорим і безбарвним. Осад поступово блідне, іноді цілком зникає. У контролі він залишається зеленим, а інтенсивність забарвлення збільшується в приповерхньому шарі. Надосад з досліді використовується в наступних пасажах до появи реакції пригнічення. Накопичений передбачуваний альговірусний ізолят піддається подальшому вивченню: вплив хлороформу, антибіотиків, заморожування, титрування і серологічного дослідження, електронна мікроскопія й ін.

Приклад реалізації способу.

Всі описувані процедури пропонованого способу ізоляції патогенних альговірусів проводили при використанні стерильного скляного лабораторного посуду.

Як індикаторну культуру для ізоляції альговірусів з досліджуваного матеріалу (морська вода, мантийна рідина мідій, 10%-на водяна суспензія тканин обрастателів ступок раковин, каменів і інших об'єктів) використовували музейну культуру міководорості *Platymonas viridis* Rouch (Chlorophita), отриману у відділі фітопланктону ІНБПМ НАН України.

Міководорості культивували в плоскодонних колбах ємністю 250-1000мл у стабілізуючому (підтримуючому) середовищі Гольдберга при температурному режимі від 14° до 28°С, при природній розсіяній освітленості 700-800лк, або при штучному світлі - не менш 400лк. Штучне освітлення застосовували в осінньо-зимовий період, коли тривалість світлового періоду доби різко скорочується. Культуру міководоростей використовували для зараження досліджуваним матеріалом у логарифмічній стадії зростання при концентрації не вище 10⁴кл/мл. При такій щільності клітин культури міководорості *Platymonas viridis* має яскраво-зелене забарвлення і будь-який вплив на неї дуже добре помітно.

Досліджуваний матеріал - морську воду - не піддавали попередній обробці. Її використовували для зараження культури міководорості протягом 1-2год. після забору води і не зберігали, тому що відбувається розпад передбачуваних у матеріалі альговірусів, що різко знижує імовірність їхнього виділення.

Перед зараженням досліджуваним матеріалом міководорість *Platymonas viridis* розливали по 2,0мл у стерильні бактеріологічні пробірки з використанням стерильних піпеток. Потім у пробірки додавали по 2,0мл досліджуваного матеріалу. У контроль - до 2,0мл культури міководорості додавали 2,0мл стабілізуючого середовища Гольдберга. Потім дослідні і контрольні пробірки переносили до штативи і залишали в умовах, описаних вище (при температурному режимі від 14° до 28°С, при природній розсіяній освітленості 700-800лк, або при штучному світлі - не менше 400лк). Спостереження вели протягом 20 днів. Через 7-14 днів спостерігали ефект пригнічення культури міководоростей у досліді, який свідчив про наявність у матеріалі патогенних

мікроорганізмів. Цей ефект проявлявся в осіданні клітин водорості на дно і проясненні надосадової рідини. Через кілька днів осад на дні починав бліднути, а надосадова рідина ставала прозорою. При подальших пасажах (2,0мл надосадової прозорої рідини з досліді додали до 2,0мл культури мікроводорості) ефект пригнічення розвитку закріплювався, а час до появи перших ознак інгібування скорочувався. При проведенні послідовних пасажів установлювали інкубаційний період (час до появи перших ознак пригнічення), що складав 24-48 год. Якщо ж пригнічення було викликано не мікробіологічним об'єктом, а, наприклад, токсином чи іншим хімічним реагентом, то при наступних пасажах його ефект слабшав і кінець кінцем зникав.

Якщо ефект інгібування закріплювався, то після накопичення патогенного мікроорганізму, можна проводити його вивчення - визначення титру інфекційності, вивчення морфологічних та біофізичних властивостей, визначення розміру альговірусів шляхом фільтрування, серологічні дослідження та інше.

Запропонований спосіб має ряд переваг:

- вперше запропонований спосіб для пошуку альговірусів у морському середовищі на прикладі одноклітинної водорості *Platymonas viridis*.

- не вимагає спеціальних лабораторних умов і може бути застосованим у польових умовах завдяки простоті проведення.