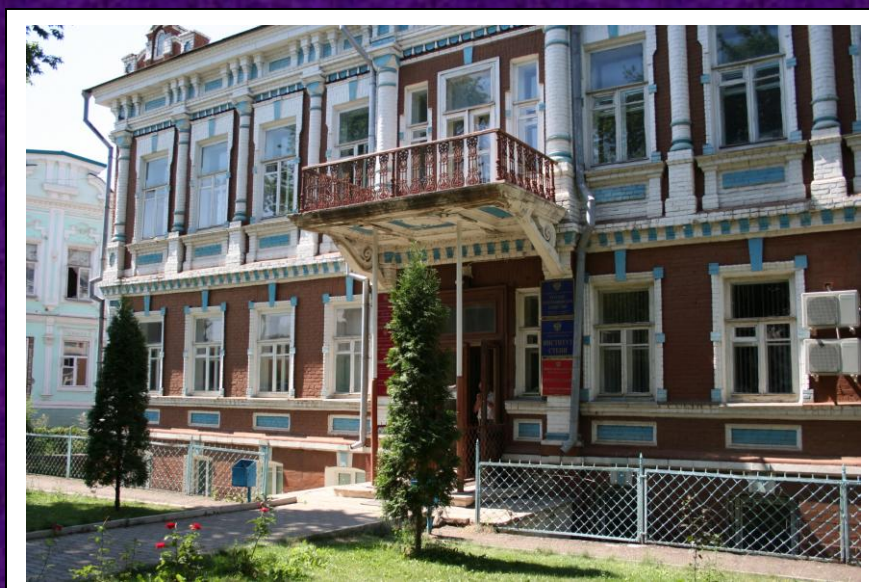


ISSN 2304-9081

**Учредители:**  
Уральское отделение РАН  
Оренбургский научный центр УрО РАН

**Бюллетень**  
**Оренбургского научного центра**  
**УрО РАН**  
(электронный журнал)



**2012 \* № 1**

On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2012

УДК 582.26

*Н.В. Немцева, Е.А. Селиванова, Т.Н. Яценко-Степанова, М.Е. Игнатенко*

**ИЗУЧЕНИЕ АЛЬГОПЛАНКТОНА ВОДОЕМОВ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ СОЛЕННОСТИ И ПОИСК НОВЫХ ШТАММОВ ВОДОРΟΣЛЕЙ ПРОДУЦЕНТОВ - БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Показано, что основу флористического разнообразия водорослей Соль-Илецких озер составляют отделы Chlorophyta, Cyanophyta и Bacillariophyta, являющиеся наиболее устойчивыми к засолению. На изменение численности альгопланктона большое влияние наряду с абиотическими факторами оказывают межвидовые конкурентные взаимоотношения и взаимоотношения в системе «хищник-жертва», складывающиеся между зоопланктоном и водорослями. Разработана схема выделения водоросли *Dunaliella salina* в культуре и оценен биотехнологический потенциал выделенного штамма.

*Ключевые слова:* альгопланктон, видовое богатство, динамика, доминантные виды, *Dunaliella salina*, штамм-продуцент.

*N.V. Nemtseva, E.A. Selivanova, T.N. Yatsenko-Stepanova, M.E. Ignatenko*

**THE STUDY OF ALGAE PLANKTON ALЬГОПЛАНКТОНА RESERVOIRS WITH DIFFERENT SALINITY LEVELS AND SEARCH FOR NEW STRAINS OF ALGAE - PRODUCERS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

The main orders of algae diversity are Chlorophyta, Cyanophyta, Bacillariophyta in Salt-Iletsks' Lakes, because they are the most stable to increased salinity. The changes in the number of algae depend of abiotic factors, competitive relationships and "predator-prey" interspecific relationships between zooplankton and algae. The scheme of isolation of the algae *Dunaliella salina* was developed and high biotechnological capacity of this strain was shown.

*Key words:* algoplankton, species richness, dynamics, dominant species, *Dunaliella salina*, strain-producer.

**Введение**

Высокоминерализованные водоемы привлекают внимание исследователей не только в плане оценки особенностей биоценологических взаимоотношений биоты, но как источники новых биотехнологически перспективных штаммов микроорганизмов с высоким адаптивным потенциалом. Многие исследователи сходятся во мнении о высокой ценности экзометаболитов микробного происхождения, являющихся биологически активными веществами, не только принимающих участие в формировании биоценологических связей в природных сообществах водоемов, но и играющих значительную роль в

жизнедеятельности человека [10, 4]. Некоторые одноклеточные зеленые водоросли, благодаря своей способности продуцировать метаболиты с ценными свойствами, в настоящее время уже используются в практике [15, 18].

На территории Оренбургской области находятся Соль-Илецкие озера, представляющие собой группу соленых континентальных водоемов, расположенных над поверхностью месторождения поваренной соли, возникшего в результате пересыхания древнего первичного океана. Эти озера активно используются в бальнеологических целях, тогда как в качестве объекта биотехнологического поиска их биоценозы изучены недостаточно [8].

В связи с вышеизложенным, целью работы явилось изучение видового разнообразия, структуры и динамики альгопланктона Соль-Илецких озер, различающихся по уровню солености, и отбор культур водорослей продуцентов биологически активных веществ.

### **Материалы и методы**

Материалом для исследования послужили планктонные пробы из оз. Развал, Дунино, Малое Городское (Соль-Илецкий район, Оренбургская область) в течение 2004–2007 гг. Вода всех исследованных водоемов относится к хлоридно-натриевому типу. Озеро Развал - водоем техно-карстового происхождения. Среднегодовая глубина составляет 15 м. Характеризуется высоким содержанием солей, преимущественно хлорида натрия, вплоть до формирования насыщенного и пересыщенного раствора. Озеро Дунино карстового происхождения, его отличительной гидрохимической особенностью является высокая соленость, достигающая 170 г/л, и значительное содержание магния и кальция. Жесткость воды в данном озере на порядок выше, чем в остальных. Глубина озера – 13 м. Озеро Малое Городское, максимальная глубина которого достигает 15 м, имеет карстовое происхождение. Общее содержание солей находится в пределах 10–26 г/л. Кривые сезонных колебаний уровня солености в поверхностных слоях вод данных водоемов сходны и характеризуются летним нарастанием и снижением в холодное время года.

Поверхностные пробы воды отбирали с помощью батометра Рутнера с глубины 50 см. После фиксации формалином пробы концентрировали седиментационным методом до конечного объема 10 мл [7]. Численность водорослей определяли путем подсчета в камере Нажотта при световой микроскопии (микроскоп Axiostar plus. Carl Zeiss). Идентификацию водорослей

проводили в соответствии с определителями [6, 9, 12, 19]. При оценке структуры альгоценозов каждого водоема учитывали: число видов, и их встречаемость. Доминирование водорослей оценивали с учетом их встречаемости и численности, в соответствии с индексом Паляя-Ковнацки [14].

Лабораторное культивирование водорослевой культуры *Dunaliella salina* осуществляли с использованием соответствующих сред ОПС, Ven-Amotz и стерильной природной воды с добавлением нитратов и фосфатов. Водоросли культивировали при температуре +20...+25<sup>0</sup>С в непрерывном режиме освещения люминесцентными лампами (5000 лк) с ежедневным перемешиванием в течение 16 ч. Пересевы осуществляли с периодичностью 1 раз в 2 месяца. Антиоксидантную активность клеточного экстракта водоросли *Dunaliella salina* определяли в соответствии с методикой, предложенной Р.Р. Фахрутдиновым [13]. Антиоксидантные свойства клеточного экстракта водоросли *D. salina* оценивали по его способности тормозить процессы перекисного окисления липидов, о скорости которых судили по интенсивности хемилюминесценции, с помощью хемилюминомера ХЛ-003. Антагонистическую активность экстрактов исследуемых микроорганизмов определяли фотометрическим методом [2].

Полученные данные подвергали статистической обработке с помощью Excel 7,0 for Windows XP.

### **Результаты и обсуждение**

В исследованных водоемах за весь период наблюдения обнаружено 50 видов водорослей, относящихся к 7 отделам. Наиболее часто встречались водоросли отдела Chlorophyta (38 %). Это объясняется присутствием в данном таксоне широко распространенных галофильных видов водорослей рода *Dunaliella*. Реже обнаруживали представителей отделов Cyanophyta, Bacillariophyta, Dinophyta, Cryptophyta и Euglenophyta: 25%, 24 %, 6 %, 4 % и 3 %, соответственно. Золотистые водоросли встречались эпизодически, что свидетельствует об их низкой приспособленности к условиям нарастающей минерализации.

Только представители двух отделов Chlorophyta и Bacillariophyta встречались во всех исследуемых озерах, что объясняется их широкой экологической валентностью, способствующей выживанию в условиях широкого диапазона солености, с одной стороны, и поступлением с прилегающих тер-

риторий в результате почвенных привносов, с другой.

В солоноватых и соленых водоемах наиболее разнообразно были представлены отделы Cyanophyta и Chlorophyta. Меньшим видовым разнообразием отличался отдел Bacillariophyta, включавший 10 видов. Отделы Euglenophyta и Dinophyta насчитывали по 3 вида. Отделы Cryptophyta и Chrysophyta были представлены лишь одним видом.

Видовое и таксономическое богатство альгопланктона снижалось по мере увеличения солености водоема. В озере Малое Городское обнаруживали, в среднем, 13 видов в одной пробе. Менее богатым по сравнению с предыдущим водоемом оказалось озеро Дунино, здесь, в среднем в одной пробе, обнаруживали 5 видов, принадлежащих 3 отделам: Chlorophyta, Cyanophyta и Bacillariophyta. Озеро Развал характеризовалось наименьшим видовым богатством водорослей, в среднем 2 вида в одной пробе, относящихся к отделам Chlorophyta и Bacillariophyta.

Таким образом, таксономическое и видовое богатство водорослей, находясь в обратной зависимости от уровня солености, убывало в ряду Малое Городское > Дунино > Развал. Полученные данные демонстрируют лимитирующее влияние среды, что согласуется с данными других исследователей для ряда аналогичных водоемов [16, 21]. По мере снижения солености в исследуемых водоемах наиболее интенсивно увеличивалось разнообразие сине-зеленых и диатомовых водорослей, являющихся типичными морскими формами. Подобное явление характерно и для других соленых водоемов [3].

Отмечены различия в сезонной динамике видового богатства водорослей в Соль-Илецких озерах (рис. 1).

В озере Малое Городское число видов зарегистрированных летне-осенний период было в 4 раза больше, чем зимой и весной, что закономерно связано с изменением светового и температурного режимов. Видовое богатство достигало в этом озере максимума к сентябрю (рис. 1). В озере Дунино кривая количества видов водорослей достигала максимума к первой половине лета с последующим снижением до 1–4 видов в пробе в августе. С учетом совпадающего по времени нарастания минерализации полученные данные демонстрируют не только влияние света и температуры, но и действие уровня солености. Видовое богатство озера Развал отличалось наименьшим раз-

нообразиям, что определялось лимитирующими условиями экстремальной солености. Отмечено незначительное увеличение количества видов за счет появления диатомовых водорослей, которое здесь регистрировали весной, во время сильного разбавления рапы ливневыми и паводковыми стоками.

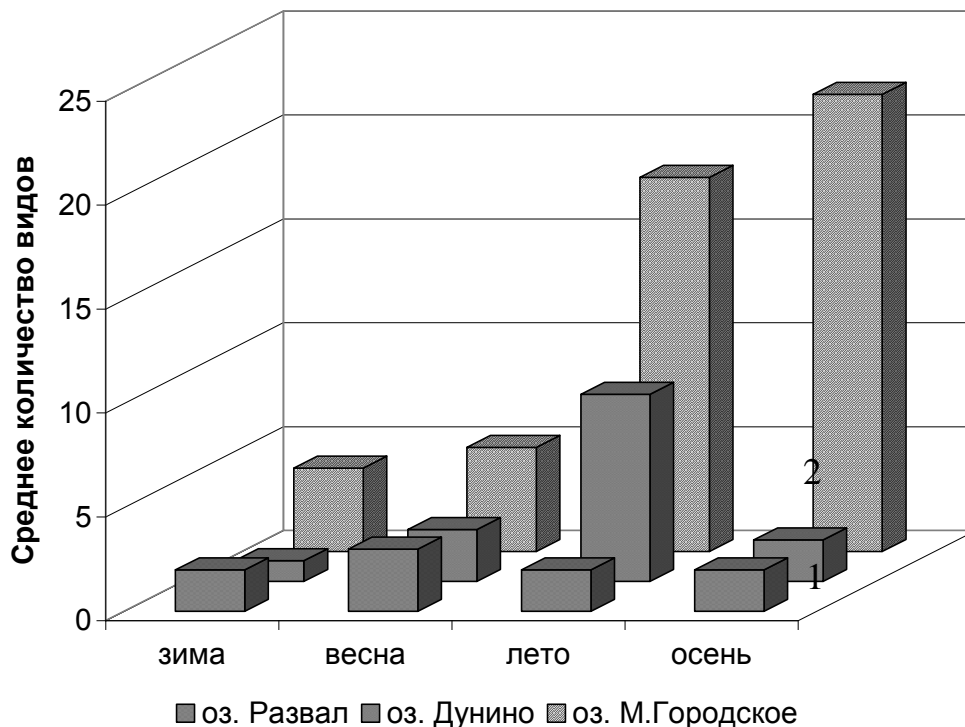


Рис. 1. Сезонная динамика видового богатства водорослей в Соль-Илецких озерах.

Сезонная динамика численности водорослей каждого из обследованных водоемов характеризовалась индивидуальными особенностями. Так, в солоноватом озере Малое Городское отмечено нарастание численности водорослей с наступлением весны с последующей стабилизацией в летний период и «скачок» численности до уровня «цветения» в сентябре. Для озера Дунино была характерна другая закономерность: численность водорослей увеличивалась зимой и весной, а в летние месяцы уменьшалась, что, вероятно, связано с активным «выеданием» водорослей жаброногими рачками *Artemia salina*, активно развивавшимися в этот период. Наблюдаемая нами картина согласуется с экспериментальными данными, свидетельствующими о способности *Artemia salina* быстро снижать биомассу фитопланктона [17]. В гипергалинном озере Развал, где из-за высокой концентрации соли отсутствовали альгофаги, способные ограничивать численность водорослей, летом на-

блюдалось массовое развитие водорослей, тогда как зимой количество водорослей плавно снижалось, достигая минимальных значений весной.

Таким образом, была выявлена зависимость динамики численности водорослей от сезона и солености воды. Самая высокая численность альгопланктона –  $6,0 \times 10^8$  клеток/л была зарегистрирована в озере с наименьшей соленостью – Малом Городском, тогда как минимальная – в озере Развал –  $5,6 \times 10^6$  клеток/л.

Каждое озеро характеризовалось специфическим составом доминирующих видов водорослей, определяющих уникальность сообщества. В соответствии с индексом Паляя-Ковнацки, к доминирующим видам в озере Развал были отнесены *Dunaliella salina* и *Dunaliella viridis*. Для озера Дунино *D. viridis* оказалась доминантом, а *D. salina* – субдоминантом, остальные виды вошли в группу сопутствующих. В озере Малое Городское 3 вида: *Oscillatoria subtilissima*, *Prorocentrum* sp., *Carteria salina* были отнесены к доминирующим, а остальные виды – к сопутствующим.

Отмечено, что в гипергалинных водоемах структура альгосообщества более стабильна, по сравнению с мезогалинным озером Малое Городское, где доминирующие комплексы значительно изменялись в течение года. В Малом Городском доминирующими по численности водорослями зимой оказались *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) и *Synechocystis salina* Wisl. (Cyanophyta), составившие 70 и 25 % соответственно от общего количества, весной доминировали *Carteria salina* Wisl. (Chlorophyta) – 63 % и *Oscillatoria subtilissima* Kutz. (Cyanophyta) – 23 %. В первой половине лета наблюдалось цветение водорослей *Prorocentrum* sp. (Dinophyta), доля которых составила 78,5 %, а в августе и с наступлением осени в массовом количестве развивались сине-зеленые водоросли *Oscillatoria subtilissima* Kutz. (74–95,5 %). В целом, видовой состав альгопланктона в Соль-Илецких озерах сходен с солеными и солоноватыми водоемами других территорий [3].

В озере Развал водоросли рода *Dunaliella* были представлены двумя видами: *D. salina* и *D. viridis*. Летом преобладала *D. salina*, а к осени увеличивалась численность *D. viridis*, достигая 40%, подобное соотношение сохранялось зимой. Весной при общем снижении численности водорослей, отмечалось преобладание *D. viridis*. Являясь постоянным обитателем озера Развал, *D. salina* периодически летом (июль-август) давала вспышки массового

развития, когда численность достигала  $11,8 \times 10^6$  клеток/л, вызывая «цветение» воды, приобретающей бурый оттенок.

Оценка сезонной динамики численности двух видов водорослей рода *Dunaliella* в оз. Развал показала, что при снижении солености наблюдалось преимущественное развитие *D. viridis*, тогда как в условиях большей солености преобладали водоросли *D. salina*, что свидетельствует об антагонистических взаимоотношениях этих видов. Факт конкуренции между данными видами доказан экспериментально: при низкой солености *D. viridis* оказывает выраженное антагонистическое воздействие на *D. salina* [20], что следует принимать во внимание при их совместном выращивании. Поскольку водоросли *Dunaliella*, используются как источники ценных метаболитов, штамм *D. salina*, обитающий в озере Развал, представляет практический интерес. С учетом штаммовой вариабельности биотехнологического потенциала водорослей данного вида [22] необходимо изучение каждого нового изолята.

Поэтому дальнейшее внимание было сконцентрировано на новом штамме водоросли *D. salina*, депонированном нами в Коллекции одноклеточных водорослей (IPPAS) под регистрационным номером IPPAS 295. Для получения чистой культуры водоросли была разработана схема выделения с учетом исходной численности клеток в образце (рис. 2).

Анализ биологических особенностей экстракта водоросли *D. salina*, выращенной в оптимальных условиях показал, что экстракт дуналиеллы, проявляет антиоксидантные свойства. Антиоксидантную активность экстракта дуналиеллы сравнивали с активностью препаратов «Биоастин» и «Ретинол» (табл.). Добавление клеточного экстракта водоросли к стандартной хемилюминесцентной системе снижало интенсивность свечения стандартной хемилюминесцентной системы на 40%.

Исходя из представленных в таблице 1 результатов, уровень антиоксидантной активности исследуемой культуры сопоставим с препаратом «Биоастин», содержащем вытяжку из водоросли *Haematococcus pluvialis*. Антиоксидантное действие водоросли *D. salina* было подтверждено в эксперименте *in vivo*, о чем судили по снижению интенсивности процессов перекисного окисления липидов в сыворотке крови экспериментальных животных [11].



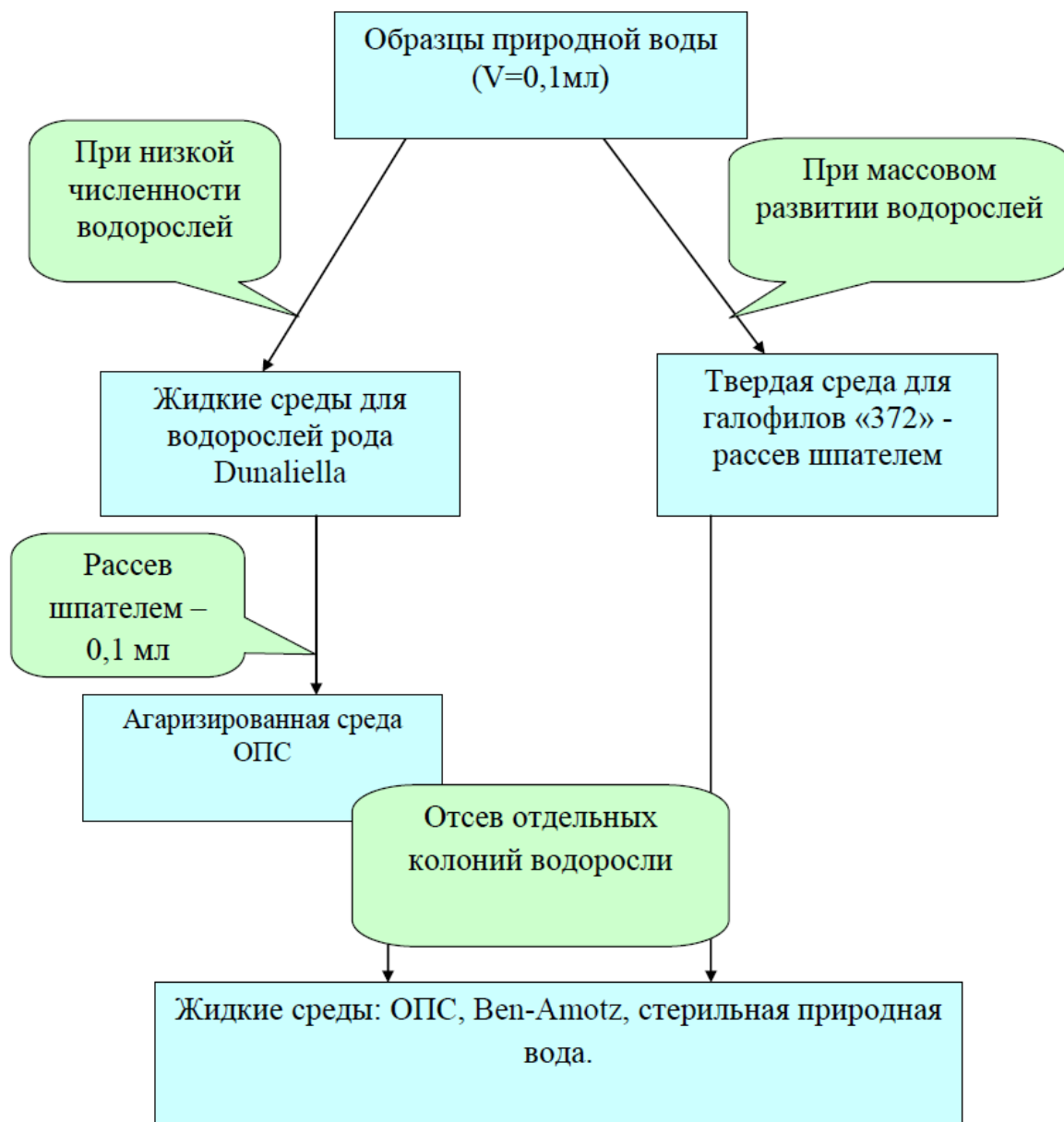


Рис. 2. Схема получения аксенических культур водорослей рода *Dunaliella*.

Таблица. Сравнительная характеристика антиоксидантной активности различных препаратов

	Спонтанная светимость	Свето-сумма	Быстрая вспышка	Максимальная светимость
Сыворотка	0,71	4,60	0,89	1,14
Биоастин	0,37	1,53	0,37	0,37
Экстракт <i>D. salina</i>	0,37	1,17	0,42	0,37
Ретинол	0,22	0,73	0,42	0,36

При оценке межмикробных взаимодействий установлено, что по отношению к некоторым условно-патогенным бактериям живые клетки водоросли и экстракты клеток оказывали различное влияние. При сокультивировании живой водоросли с *E. coli* графики изменения численности кишечной палочки как в опытной, так и в контрольной пробе, соответствовали S-образным кривым. Начиная с 5 ч, количество *E. coli* в опыте в присутствии живых клеток водоросли почти на порядок было выше, чем в контроле; такое соотношение сохранялось вплоть до 15 ч. К концу первых суток численность кишечной палочки в контроле критически падала до нуля. В ассоциации с *D. salina* количество *E. coli* сокращалось постепенно вплоть до полной гибели бактерий к 44 ч. Таким образом, период выживания бактерий в присутствии клеток дуналиеллы увеличился почти в два раза по сравнению с контролем. Наблюдаемый протективный эффект со стороны дуналиеллы по отношению к условно-патогенным бактериям можно объяснить выделением в среду живыми галофильными водорослями осмопротекторных веществ, способствующих удлинению сроков выживания негалофилов в условиях повышенной солености. Экстракт клеток *D. salina* оказывал противоположный эффект на *E. coli*, укорачивая сроки ее выживания и способствуя более быстрой элиминации. Уже через 5 часов концентрация эшерихий снижалась почти на порядок по сравнению с контролем и на два порядка по сравнению с ассоциацией бактерий с живыми водорослями. Срок выживания *E. coli* в среде с экстрактом водоросли составил 19 часов. Одновременно выявлена антагонистическая активность клеточного экстракта культуры *D. salina* в отношении условно-патогенных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, выражающаяся в снижении роста этих бактериальных культур на 60 и 15%, соответственно. Ускорение очищения среды от энтеробактерий в присутствии экстракта водоросли, возможно, связано с действием бактерицидных веществ, выделяющихся в среду при разрушении клеток водорослей и, вероятно, связано с бактерицидным действием белково-хлорофильного комплекса, обнаруженным рядом исследователей у зеленых водорослей, в том числе у водорослей родов *Dunaliella* и *Haematococcus* [5].

Полученные данные свидетельствуют в пользу практической перспективности выделенного штамма *D. salina* IPPAS 295, обладающего антиоксидантной и антагонистической активностью, как в экологии для самоочище-

ния водоема, так и в медицине в качестве источника биологически активных веществ.

В результате проведенных исследований показано, что основу флористического разнообразия водорослей Соль-Илецких озер составляют отделы Chlorophyta, Cyanophyta и Bacillariophyta, являющиеся наиболее устойчивыми к засолению. Динамика видового богатства водорослей в исследуемых соленых водоемах нарастает по мере уменьшения солености. На изменение численности альгопланктона большое влияние наряду с абиотическими факторами оказывают межвидовые конкурентные отношения. Особое значение для продуктивности озер со средним и низким уровнем солености имеют взаимодействия в системе «хищник-жертва», складывающиеся между зоопланктоном и водорослями. Показано, что в гипергалинных Соль-Илецких озерах присутствует водоросль *D. salina*, обладающая высоким биотехнологическим потенциалом, поддающаяся лабораторному культивированию. Разработана схема выделения и установлены оптимальные параметры поддержания данной водоросли в культуре, способствующие максимальной интенсивности роста. Разработанная технология культивирования нового штамма водоросли *D. salina* в совокупности с уникальными биологическими свойствами культуры определяют перспективность ее применения в биотехнологии.

*Работа выполнена по гранту № 12-П-4-1039 программы Президиума РАН «Биоразнообразие» и инициативному проекту УрО РАН (№ 12-И-4-2034).*

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Блюмина Л.С. Биология соленых Соль-Илецких озер: Автореф. канд. биол. наук, М., 1958. 17 с.
2. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. Бюлл. эксп. биол. 2000. 130 (7): 80-82.
3. Горбулин О.С., Догадина Т.В., Косик Е.Л. Водоросли техногенных соленых озер Донбасса. Вестник ХНАУ. Серія «Біологія». Харків, 2003. 5: 80–93.
4. Ефимов А.А., Белова Т.П., Ефимова М.В. Обоснование использования синезеленых водорослей для выделения хлорофилла и фикобилипротеинов как пищевых красителей и биологически активных веществ. Успехи современного естествознания. 2007. 11: 77-80.
5. Максимова И.В., Сидорова О.А. Светозависимый антибактериальный эффект водорослей и его экологическое значение (обзор). Гидробиологический журнал. 1986. 22 (6): 3-11.
6. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы практического использования. Киев: Наукова думка, 1973. 244 с.

7. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов./ Под ред. Ф.Д. Мордухай-Болтовского. М.: Наука, 1975. 240 с.
8. Немцева Н.В., Плотников А.О., Яценко-Степанова Т.Н., Селиванова Е.А., Шабанов С.В. Планктонные сообщества уникальных гипергалинных мезогалинных озер Оренбуржья. Вестник ОГУ. 2005. 5: 35–40.
9. Определитель пресноводных водорослей СССР. Т. 1-14. / Под ред. М. М. Голлербаха. М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1951–1986.
10. Сакевич А.И. Экзометаболиты пресноводных водорослей. Киев: Наук. думка. 1985. 200 с.
11. Селиванова Е.А., Немцева Н.В., Плотников А.О., Красиков С.И., Шарапова Н.В. Влияние водоросли *Dunaliella salina* на антиоксидантную активность сыворотки крови экспериментальных животных. Медицинская наука и образование Урала. 2011. 1: 86–88.
12. Царенко П.М. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. Киев: Наукова думка, 1990. 208 с.
13. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. Уфа, 1995. 54 с.
14. Шитиков В.К., Розенберг Г.С., Зинченко Т.Д. Количественная гидроэкология: методы системной идентификации. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2003. 463 с.
15. Ben-Amotz A., Avron M. Glycerol and beta carotene metabolism in the halotolerant alga *Dunaliella*: A model system for biosolar energy conversion. Trends Biochem. Sci. 1981. 6: 297–299.
16. Borowitzka L.J. The microflora. Hydrobiologia. 1981. 81: 33–46.
17. Jones A.G., Ewing C.M., Melvin M.V. Biotechnology of solar saltfields. Hydrobiologia, 1981. 82: 391–406.
18. Kay R.A., Barton L.L. Microalgae as food and supplement. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1991. 30 (6): 555–573.
19. Komarek J., Anagnostidis K. Cyanoprocaryota. 1. Teil. Chroococcales. Süßwasserflora Mitteleuropa. 19/1 – Jena: Fischer Verlag. 1999. 548 p.
20. Moulton T.P., Sommer T.R., Burford M.A. et al. Competition between *Dunaliella* species at high salinity. Hydrobiologia. 1987. 151-152: 107–116.
21. Post F.J., Borowitzka L.J., Borowitzka M.A. et al. The Protozoa of a Western Australian hypersaline lagoon. Hydrobiologia. 1983. 105: 95-114.
22. Tafreshi A. H., Shariat M. *Dunaliella* biotechnology: methods and applications. J. of Applied Microbiology. 2009. 107: 14–35.

Поступила 11.01.2012

(Контактная информация: **Немцева Наталия Вячеславовна** – д.м.н., профессор, заведующая лабораторией водной микробиологии Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел/факс (3532) 77-54-17; E-mail: [nemtsevanv@rambler.ru](mailto:nemtsevanv@rambler.ru))