

УДК 561.263(470.56)

О НАХОДКЕ ГАЛОТОЛЕРАНТНОЙ ВОДОРОСЛИ *ASTEROMONAS GRACILIS* ARTARI В ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ

Н. В. Немцева, М. Е. Игнатенко

*Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
Россия, 460000, Оренбург, Пионерская, 11
E-mail: nemtsevanv@rambler.ru*

Поступила в редакцию 13.11.10 г.

О находке галотолерантной водоросли *Asteromonas gracilis* Artari в Оренбургской области. – Немцева Н. В., Игнатенко М. Е. – Галотолерантная водоросль *Asteromonas gracilis* Artari выделена из планктонного сообщества грязе-рапного озера Тузлучное, относящегося к группе грязе-рапных озёр Соль-Илецкого курорта. Данный вид зеленой водоросли отсутствует в списке альгофлоры Соль-Илецких водоёмов и является новым для территории Степного Предуралья. Морфология данной водоросли изучена с использованием световой фазово-контрастной микроскопии, представлены оригинальные фотографии. В лабораторных условиях выявлен диапазон галотолерантности, подобран оптимальный режим культивирования. Экспериментально продемонстрировано наличие антилизосимной и антагонистической активности у данной водоросли.

Ключевые слова: галотолерантная водоросль, *Asteromonas gracilis*, антилизосимная активность, антагонистическая активность.

Discovery of halotolerant alga *Asteromonas gracilis* Artari from phitoplancton in the Orenburg region. – Nemtseva N. V. and Ignatenko M. E. – The halotolerant alga *Asteromonas gracilis* Artari was isolated from the planktonic association of the Tuzluchnoye Lake, related to the group of salt lakes of the Sol-Ilets'k resort. This type of green alga is absent in the algae vegetation list of the Sol-Ilets'k reservoirs and is new for the Steppe Pre-Ural area. The morphological structure of this alga was studied by means of phase-contrast microscopy (original photos are enclosed). The range of halotolerance was estimated and an optimum regime of cultivation was chosen in laboratory conditions. The presence of antilysocyme and antagonistic activity was experimentally shown for this alga.

Key words: halotolerant alga, *Asteromonas gracilis*, antilysocyme activity, antagonistic activity.

Соленые континентальные водоёмы, концентрация рассолов в которых может достигать до 300 г/л, представляют собой уникальные естественные местообитания. Сообщества микроорганизмов, населяющие эти водоёмы, привлекают внимание исследователей как аналоги древних экосистем, а также как рефугиумы для современных микроорганизмов.

На территории Оренбургской области располагается оз. Тузлучное, входящее в группу из шести Соль-Илецких водоёмов, солёность в которых убывает в ряду: оз. Развал (свыше 270 г/л), Новое (228 г/л), Дунино (170 г/л), Тузлучное (65 – 130 г/л), Малое Городское (10 – 26 г/л). Геохимические и флористические исследования озёр начаты приблизительно с 50-х гг. XX в. и продолжаются по настоящее время. За более чем полувековую историю изучения различными исследователями была дана детальная оценка сообществ бактерио-, фито- и зоопланктона этих озёр (Блюмина, 1958; Абдрахманов, 2001; Плотников, 2002; Яценко-Степанова и др., 2005;

Селиванова, 2007). В планктонных сообществах выделены представители основных функциональных групп, свидетельствуя о полноценности этих природных биоценозов. Определен трофический статус Соль-Илецких водоёмов, продукционные процессы в которых осуществляются зелеными и динофитовыми водорослями, а также цианеями (Селиванова, 2007).

В структуре альгоценоза в разных озерах этой группы отмечено преобладание *Dunaliella salina* Teodorescu, 1905, *Dunaliella viridis* Teodorescu, 1906, *Carteria salina* Wislouch, *Oscillatoria subtilissima* Kütz., *Prorocentrum* sp., в оз. Тузлучное на протяжении ряда лет также регистрировались зеленые водоросли, относящиеся к семейству Dunaliellaceae (Яценко-Степанова и др., 2005; Селиванова, 2007).

Начиная с октября 2008 г. по сентябрь 2009 г. в составе фитопланктона отмечено появление новой водоросли, относящейся к семейству Asteromonadaceae.

Целью работы явилась морфологическая и экофизиологическая характеристика этого микроорганизма.

Материалом для исследования послужили пробы фитопланктона оз. Тузлучное, собранные в 2008 – 2009 гг. Альгологические пробы обрабатывали общепринятыми методами (Вассер и др., 1989). Подсчет численности водорослей проводили в камере Нахотта объёмом 0.01 мм³; определение биомассы осуществляли счетно-объемным методом (Методика..., 1975; Вассер и др., 1989). Водоросли изучали в живом и фиксированном состоянии под световым микроскопом марки «Axiostar plus» (Carl Zeiss). Учет размеров клеток производили микроскопически при помощи электронной линейки (Cool Ruler), предварительно откалиброванной по изображению сеток при увеличении от 400 до 1000. Средние размеры указаны с доверительным интервалом при уровне значимости $p = 0.05$. Микрофотографии водорослей выполнены с использованием цифровой фотокамеры Canon PowerShot G5 при увеличении от 400 до 1000.

Культивирование проводили на среде ОПС следующего состава: NaCl – 116.0 г/л; MgSO₄×7H₂O – 50.0 г/л; KNO₃ – 2.5 г/л; K₂HPO₄ – 0.2 г/л; NaHCO₃ – 1.0 г/л. Для выяснения зависимости урожая биомассы от осмотических характеристик культуры водоросли выращивали на минеральной среде при градиенте концентраций NaCl от 32.9 до 279.2 г/л. В зависимости от задач водорослевые клетки выращивали в плоскодонных колбах объёмом 250 мл или в пробирках по 10 мл в условиях искусственной непрерывной инсоляции (5000 лк) при температуре + 25°C. Содержание NaCl, а также pH и температуру рапы измеряли с помощью анализатора жидкостей «Эксперт-001». Антилизозимную активность водорослей оценивали чашечным методом (Бухарин, 1999). Антагонистическую активность клеточных экстрактов оценивали фотометрически (Бухарин и др., 2001) в отношении коллекционных штаммов бактерий, культивируемых *in vitro* в лаборатории природных микробиоценозов ИКВС УрО РАН.

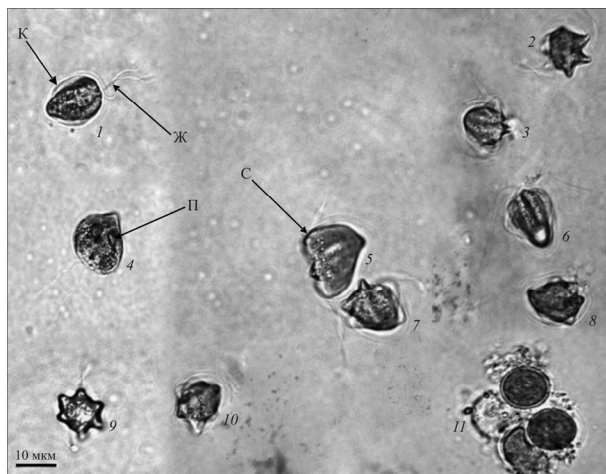
Выделение галотолерантной водоросли из грязе-рапного озера Тузлучное. Исследования проводились на оз. Тузлучное, входящего в группу грязе-рапных озёр Соль-Илецкого курорта и являющегося одним из старых водоёмов Соль-Илецкого соляного купола. Площадь озера составляет 23750 м², глубина – примерно 2.5 м, приблизительный объём – 25000 м³. На дне озера залегают мощный слой иловых отложений, толщина которого достигает более 2 м. Наиболее активную

часть пелоида составляет коллоидный комплекс, в состав которого входят сернистое железо, кремниевая кислота, мельчайшие глинистые частицы. Уровень минерализации рапы оз. Тузлучное варьирует в диапазоне от 65 до 130 г/л, с максимальной концентрацией солености 320 г/л, зафиксированной в 1955 г. (Блюмина, 1958).

Начиная с октября 2008 г. по сентябрь 2009 г. в составе фитопланктона данного озера были зарегистрированы водоросли, относящиеся к семейству *Asteromonadaceae*, массовая доля которых составляла от 30 до 99.9%. Высокая численность последних позволила выделить их в монокультуру. Выделенный изолят, получивший условный номер МТ5, был адаптирован к лабораторным условиям и культивировался на среде ОПС.

Определение систематического положения штамма МТ5 по морфологическим и культуральным свойствам. Штамм МТ5, культивируемый на жидкой минеральной среде ОПС, имел насыщенный зеленый цвет. Морфологически представлял собой одноклеточную, лишенную клеточной стенки водоросль. Клетки веретеновидной, а в ряде случаев обратно-яйцевидной формы с шестью продольно идущими килеподобными гребнями. В связи с отсутствием клеточной стенки штамм водоросли характеризуется полиморфностью и представлен типичными, звездчатыми и спирально изогнутыми формами. Четко заметен пристенный чашевидный хлоропласт с явно различимой стигмой (рисунок). Длина клетки исследуемого штамма варьировала от 13 до 20 мкм, а ширина – от 7 до 13 мкм, при средних значениях 15.26 ± 0.29 мкм $\times$ 11.12 ± 0.25 мкм. Vegetативные формы несли 2 жгутика, длина которых колебалась от 16 до 26 мкм (22.18 ± 1.96), превышая длину самой клетки в 1–2 раза.

Обычно *A. gracilis* размножалась продольным делением. Это согласуется с данными, полученными L. S. Peterfi, I. Manton (1968). Аналогично этим исследователям у данной водоросли нам не удалось выявить наличие процесса полового размножения, однако имеются сведения, что в редких случаях для нее характерно половое размножение способом изогамии с конъюгацией (Горбунова, 1961). При неблагоприятных условиях наблюдали процесс инцистирования, при котором клетки обездвиживались, утрачивали жгутики, приобретали сферическую форму, покрываясь плотной оболочкой.



Морфология выделенной из оз. Тузлучное зелёной водоросли *Asteromonas gracilis* Artari, световая иммерсионная микроскопия, фазовый контраст $\times 1000$: 1 – 10 – вегетативные формы, характеризующиеся полиморфизмом; К – капюшон, Ж – жгутики; С – стигма; П – пиреноид; 11 – цисты

По морфологическим характеристикам с использованием светомикроскопического изучения морфологии в сравнении с оригинальными рисунками, микрофотографиями и описаниями, ранее выполненными рядом исследователей (Artari, 1913; Peterfi, Manton, 1968), выделенный штамм водоросли отнесен к роду *Asteromonas* и виду *Asteromonas gracilis* Artari, 1913.

Данный вид галотолерантной водоросли – *A. gracilis* (Eukaryota, Viridiplantae, Chlorophyta, Chlorophyceae, Chlamydomonadales, Asteromonadaceae, *Asteromonas*) впервые выявлен на территории Оренбургской области и является новым представителем альгофлоры этого региона.

На территории России *A. gracilis* обнаружен лишь в нескольких районах: оз. Эльтон (Ермаков, 1926), соленые озёра Южно-Астраханской группы (Руденко и др., 1948), озёра Кулундинской степи (Исаченко, 1951), Балтийское море (Hälltr, 2004). Полученные нами данные расширяют представления о распространении *A. gracilis* на территории России, включая район Степного Приуралья.

Ростовые и физиологические характеристики. *A. gracilis* в сообществе с водорослями *D. salina* и *Pinullaria* sp. был зарегистрирован в планктоне оз. Тузлучное в октябре 2008 г. при уровне минерализации рапы 111.2 г/л, pH 8.55 и температуре 13.3°C. Численность *A. gracilis* на тот период составила 35634.0 тыс. кл/л.

Повторно *A. gracilis* был выявлен в феврале 2009 г. при уровне минерализации рапы 130 г/л, pH 6.99 и температуре -8°C. В отличие от предшествующих осенних проб в зимний период обнаруживались как вегетативные формы водоросли, так и цисты, сконцентрированные преимущественно в придонном слое.

Исследования рапы оз. Тузлучное, проводимые в мае 2009 г., выявили преобладание в фитопланктоне водорослей рода *Dunaliella* (84.7% от общей численности фитопланктона), тогда как численность *A. gracilis* составила лишь 400 тыс. кл/л, т.е. 0.2% от общего числа водорослей.

В сентябре 2009 г. структура альгоценоза оз. Тузлучное качественным образом изменилась. Было зафиксировано «цветение» водоёма, обусловленное массовым развитием водоросли *A. gracilis*, численность которой составила 3745440 тыс. кл/л (99.9% от общей численности фитопланктона) при минерализации рапы 134.1 г/л, pH 8.3 и температуре 25.6°C.

Установлено, что местный изолят водоросли давал рост и развивался в диапазоне солёности от 32.9 до 279.2 г/л, при этом максимальные величины численности были зафиксированы при уровне минерализации 54.9 – 82.4 г/л.

Отмечено, что при повышении солёности клетки приобретали большую веретеновидность по сравнению с водорослями, выросшими при низкой минерализации. Четкая зависимость морфологии клеток от концентрации солей выявлена ранее и рассматривается как результат адаптации данного микроорганизма к условиям среды (Peterfi, Manton, 1968; Ben-Amotz, Grunwald, 1981).

Анализ физиологических свойств показал, что клеточные экстракты *A. gracilis* проявляют антагонистические свойства по отношению к условно-патогенным бактериям, подавляя их рост. Выявлено ингибирование тест-культуры *Staphylococcus aureus* на 39.3% по сравнению с контролем, *Pseudomonas aeruginosa* – на 33.0%, *Enterobacter cloacae* – на 27.8%, *Salmonella* sp. – на 9.4%. Антагонистическая ак-

тивность *A. gracilis*, направленная на самоочищение рапы, может представлять интерес в плане ее практического использования.

Установлено, что водоросль *A. gracilis* обладает антилизоцимной активностью, равной 4 мкг/мл. Ранее антилизоцимный признак обнаружен у ряда пресноводных зеленых водорослей (Бухарин и др., 1997).

Поскольку антилизоцимная активность является фактором персистенции, ее наличие у данной водоросли свидетельствует о способности выживать в сообществах с другими микроорганизмами. С одной стороны, полученные результаты позволяют рассматривать *A. gracilis* в качестве одного из участников функциональной системы «лизоцим – антилизоцим» гидробионтов в соленых местообитаниях, аналогично тому, как это описано ранее для ряда пресноводных сообществ (Бухарин, Немцева, 2008). С другой стороны, наличие у *A. gracilis* антилизоцимного признака, обеспечивающего преимущественное развитие и доминирующее положение водорослей, может привести к изменению структуры биоценоза и всей экосистемы оз. Тузлучное. Учитывая, что данное озеро является основой грязе-рапного курорта, анализ состава его биоценоза требует постоянного пристального внимания. Это является мотивацией для включения обнаруженной водоросли в список видов для ведения постоянного мониторинга.

Таким образом, обнаружен новый для территории Оренбургской области вид галотолерантной водоросли *Asteromonas gracilis* Artari, что представляет интерес в плане определения распространения данного вида на территории России, а также для пополнения флористического списка соленых озёр Степного Предуралья. Практическим аспектом работы является анализ участия местного штамма в процессе самоочищения и грязеобразования водоёмов, а также рекультивации лечебной грязи.

Авторы выражают благодарность кандидату медицинских наук, доценту А. О. Плотникову за помощь в работе по получению водорослевых изолятов, а также кандидату биологических наук, доценту Т. Н. Яценко-Степановой за помощь в идентификации культуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Биоразнообразии» (проект «Биологическое разнообразие микробных сообществ водных экосистем»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абдрахманов А. Р. Микрофлора соленого водоема (озеро Развал Оренбургской области) : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2001. 21 с.
- Блюмина Л. С. Биология соленых Соль-Илецких озёр : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Оренбург, 1958. 17 с.
- Бухарин О. В., Немцева Н. В., Алехина Г. П. Лизоцимная и антилизоцимная активность альгофлоры // Микробиология, 1997. Т. 66, № 3. С. 429 – 432.
- Бухарин О. В. Персистенция патогенных бактерий. М. : Медицина, 1999. 267 с.
- Бухарин О. В., Немцева Н. В. Микробиология биоценозов природных водоемов. Екатеринбург : УрО РАН, 2008. 156 с.
- Бухарин О. В., Забирова Т. М., Чертков К. Л., Черкасов С. В., Иванов Ю. Б. Способ определения колонизационной резистентности экологической ниши тела человека // Патент РФ № 2175673. Б.И. 2001. № 31. С. 20.

Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П., Паламарь-Мордовинцева Г. М., Ветрова З. И., Кордюм Е. Л., Мошкова Н. А., Приходькова Л. П., Коваленко О. В., Ступина В. В., Царенко П. М., Юнгер В. П., Радченко О. В., Виноградова О. Н., Бухтиярова Л. Н., Разумна Л. Ф. Водоросли. Справочник. Киев : Наук. думка, 1989. 608 с.

Горбунова Н. П. Половой процесс у *Asteromonas gracilis* Artari // Бот. журн. СССР. 1961. Т. 46, вып. 7. С. 993 – 998.

Ермаков Н. В. О природе и физическом состоянии розовой окраски рапы и соли озера Эльтон // Изв. краевед. ин-та изучения Южно-Волжской области Сарат. ун-та. 1926. Т. 1. С. 31 – 45.

Исаченко Б. Л. Хлористые, сульфатные и содовые озера Кулундинской степи и биогенные процессы в них // Избранные труды. М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1951. Т. 2. С. 143 – 162.

Методика изучения биоценозов внутренних водоемов. М. : Наука, 1975. 240 с.

Плотников А. О. Механизмы формирования протозойно-бактериальных ассоциаций в водных экосистемах (экспериментальное исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2002. 24 с.

Руденко Е. И., Вепринцев И. И., Мурыгин И. И. О возможности использования некоторых соляных озер Южно-Астраханской групп для лечебных целей // Тр. Астраханского гос. мед. ин-та. 1948. Т. 9. С. 41 – 52.

Селиванова Е. А. Симбиотические связи микроорганизмов в планктонных сообществах соленых водоемов : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2007. 23 с.

Яценко-Степанова Т. Н., Немцева Н. В., Шабанов С. В. Альгофлора Оренбуржья. Екатеринбург : УрО РАН, 2005. 202 с.

Artari A. Zur physiologie der Chlamydomonaden. Versuche und Beobachtungen an *Chlamydomonas Ehrenbergii* Gorosch. und verwandten Formen // Jahrbücher auf für Wissenschaftliche Botanik. 1913. Bd. 52. S. 410 – 416.

Ben-Amotz A., Grunwald T. Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis* // Plant Physiol. 1981. Vol. 67, № 4. P. 613 – 616.

Hälltrö G. Checklist of Baltic Sea phytoplankton species (including some heterotrophic protistan groups) // Baltic sea environment proceedings. 2004. № 95. P. 208.

Péterfi L. S., Manton I. Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend. (*Stephanoptera gracilis* (Artari) Wisl.), with some comparative observations on *Dunaliella* sp. // British Phycological Bul. 1968. № 3. P. 423 – 440.