



УДК 579:582.26/. 27

Т. В. Рауэн, вед. инж., **В. С. Муханов**, к. б. н., зав. лаб., **А. Н. Ханайченко**, канд. биол. наук, ст.н.с.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь, Украина

ВЛИЯНИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* НА ДИНАМИКУ ВЫКЛЕВА *ARTEMIA SALINA* И ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ В СРЕДЕ ВЫРАЩИВАНИЯ АРТЕМИИ

С целью оптимизации выращивания *Artemia salina* и снижения бактериальной нагрузки на среду выращивания личинок при её использовании в качестве живого корма исследовано влияние культуры микроводорослей *Chlorella vulgaris* на скорость выклева науплиев артемий, динамику численности бактерий в среде их выращивания и интенсивность колонизации покровов науплиев бактериями. При добавлении *C. vulgaris* в среду инкубации артемий численность бактерий в ней была значительно ниже, чем в контроле (соответственно, $33.6 \pm 0.12 \times 10^6$ и $82.7 \pm 14 \times 10^6$ кл. мл⁻¹ спустя 25 ч, *t*-тест, $p < 0,05$), что указывает на хорошо выраженный антибиотический эффект хлореллы. В дальнейшем этот эффект сохранялся даже в условиях поступления в среду инкубации артемий большого количества органических веществ – дополнительного субстрата для бактерий, обусловленного метаморфозом науплиев, т.е. микроводоросли были способны сдерживать бактериальный рост. Присутствие *C. vulgaris* в среде инкубации артемий сокращало время выклева науплиев из цист и обеспечивало более синхронный метаморфоз, а степень колонизации покровов науплиев бактериями была достоверно ниже, чем в контроле.

Ключевые слова: микроводоросли, бактерии, проточная цитометрия, *Chlorella vulgaris*, бактерицидный эффект, *Artemia salina*

Артемия (*Artemia salina*) – наиболее широко используемый кормовой объект при выращивании личинок морских рыб. Этот вид живого корма обладает рядом преимуществ, выгодно отличающих его от других кормовых организмов. Прежде всего, это – синхронное получение большого количества одновозрастных и одноразмерных науплиев из консервированных цист за короткий срок, технологичность культивирования, высокое содержание белка [10], малые размеры науплиев (0.3 – 0.5 мм), мягкий наружный скелет и т.д. Вместе с тем, науплии артемий часто являются вектором передачи личинкам патогенных бактерий [11]. Микробиологическими исследованиями установлено, что на поверхности цист артемий в альвеолярных и кортикальных слоях их внешней оболочки локализуется значительное число бактерий [5], которые не всегда элиминируются дезинфицирующими средствами [7]. Большое количество органических веществ, накапливаемое в среде в процессе разрыва оболочки цист во время выхода из них науплиев, а также температурный диапазон, необходимый для их выклева (25 – 30°C), создают благоприятные условия

для развития внесенной в среду вместе с цистами артемий микрофлоры, большую часть которой составляют оппортунистические быстро размножающиеся бактерии – г-стратеги [25]. Именно г-стратеги, в число которых входят и опасные патогены группы *Vibrio*, чаще всего являются причиной гибели личинок рыб на ранних стадиях развития [20]. Существует ряд мер, направленных на элиминацию бактерий, ассоциированных с артемиями. Самым распространённым из них является обработка кормового объекта различными антибактериальными средствами. Однако в последнее время всё чаще публикуются данные о появлении в аквакультурных производствах резистентных к антибиотикам штаммов бактерий, что определяет необходимость поиска альтернативного решения этой проблемы [4, 24]. Некоторые авторы сообщают об эффективности подмены воды во время инкубации артемий [14], другие предлагают метод биоинкапсуляции – краткосрочной инкубации артемий в суспензии с высокой концентрацией медленно размножающихся пробиотических бактерий – К-стратегов, не патогенных для личинок рыб [15].

В ряде исследований предлагают инкубацию артемии в культурах микроводорослей [21]. Разработка методов применения микроводорослей для предупреждения вспышки бактериальных инфекций в аквакультурных производствах является актуальной задачей.

Цель данной работы заключалась в исследовании влияния культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris* на динамику выклева науплиев артемий, численность бактерий в среде их инкубации и на интенсивность колонизации бактериями внешних покровов науплиев.

Материал и методы. В экспериментах использовали неаксеничную культуру хлореллы *Chlorella vulgaris* в экспоненциальной фазе роста ($\approx 9 \times 10^7$ кл. мл⁻¹), полученную из коллекции культур морских микроводорослей (культура №25) отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ НАНУ (г. Севастополь), и сибирскую расу артемий компании Artemia Wholesale – *Artemia salina*. Микроводоросли культивировали на среде Уолна [7], приготовленной на черноморской воде 18 ‰, при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$, постоянном освещении 5 тыс. люкс, без продувки.

Цисты артемий помещали в конические колбы, содержащие 600 мл стерильной морской воды и содержали при постоянном освещении 5 тыс. люкс и температуре 28°C . Концентрация цист артемий составляла 5 мг сыр. в. л⁻¹ в соответствии с рекомендациями [26]. Экспериментальные колбы с цистами разделили на две серии по три повторности. В первую серию добавляли 50 мл стерильной морской воды 18 ‰ (контроль), во вторую – 50 мл культуры *C. vulgaris*, выращенной при солёности 18 ‰. Начальная концентрация клеток хлореллы в экспериментальных колбах с цистами артемий составляла 0.4×10^6 кл. мл⁻¹.

В ходе эксперимента проведён сравнительный анализ динамики выклева науплиев артемии и численности бактерий в среде, в колбах с добавлением (опыт) и без добавления (контроль) *C. vulgaris*. Численность науплиев определяли прямым подсчётом в камере Богорова, пробы отбирали через 18, 20 и 25 ч.

Исследования проводили с помощью методов проточной цитометрии и эпифлуоресцентной микроскопии. Для анализа динамики численности бактерий и клеток микроводорослей пробы среды отбирали из экспериментальных ёмкостей в начале эксперимента, через 20 и 25 ч и исследовали с по-

мощью проточного цитометра Cytomics™ FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованного 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программного обеспечения СХР. Общую численность микроводорослей определяли в неокрашенных пробах с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и автофлуоресценции в красной области спектра (FL4, 675 нм) на безразмерных логарифмических шкалах. Численность бактерий определяли в пробах, окрашенных SYBR Green I (Molecular Probes, США), с помощью гейтинга популяции клеток на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм) на безразмерных логарифмических шкалах.

Окраску бактерий SYBR Green I производили в соответствии с [17]. Этот флуорохром повышенной яркости с максимумами возбуждения и эмиссии соответственно 497 и 521 нм обладает высоким сродством к двухцепочечной ДНК, но способен также связываться с РНК и одноцепочечной ДНК. Рабочий раствор красителя готовили в разбавлении 10^{-2} и хранили в замороженном состоянии при -20°C . Конечное разбавление в пробе составляло 10^{-4} . Окраску производили в темноте в течение 30 мин непосредственно перед цитометрическими измерениями.

Концентрацию клеток бактерий и микроводорослей рассчитывали по скорости потока пробы (соответственно, 15 и 60 мкл мин⁻¹), времени счёта (100 – 360 с) и количеству клеток, зарегистрированных в этот промежуток времени (в пробах микроводорослей – минимум 3000 кл. для каждой из повторностей). Контроль качества измерений выполнен с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check™ (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

В качестве флуоресцентного маркера бактериальной плёнки на поверхности артемии использовали SYBR Green I. Метод окраски проб, содержащих организмы, не отличался от описанного выше. Микрофотосъёмку организмов осуществляли под микроскопом Nikon Eclipse TS100-F, оборудованным камерой Ikegami ICD-848P, в люминесцентном режиме (набор светофильтров для возбуждения в синей области спектра). Измерения цветовых/яркостных характеристик каждого из исследуемых организмов проводили с помощью

оригинального программного обеспечения ImageRegionColor v.1.3. под ОС MS Windows [2]. Программа позволяет вручную выделять очертания организма, автоматически осреднять цвет выделенной области снимка, проводит измерения в соответствии с цветовыми моделями HSB (H – цветовой тон, S – насыщенность, B – яркость) и RGB (R – красный, G – зелёный, B – синий) и сводит полученные данные в таблицу, которая экспортируется в MS Excel. Таким образом, для каждой анализируемой особи получали один набор значений из шести переменных (HSB и RGB), которые служили

показателями интенсивности бактериальной колонизации покровов организмов.

Результаты и обсуждение. В начале эксперимента численность бактерий в контрольных сосудах с артемией без добавления микроводорослей была достоверно ниже ($\approx 0.3 \pm 0.17 \times 10^6$ кл. мл⁻¹), чем в сосудах с добавлением *C. vulgaris* ($\approx 2.1 \pm 0.17 \times 10^6$ кл. мл⁻¹) (рис. 1 Б). Это обусловлено тем, что вместе с микроводорослями в среду были привнесены ассоциированные с ними бактерии.

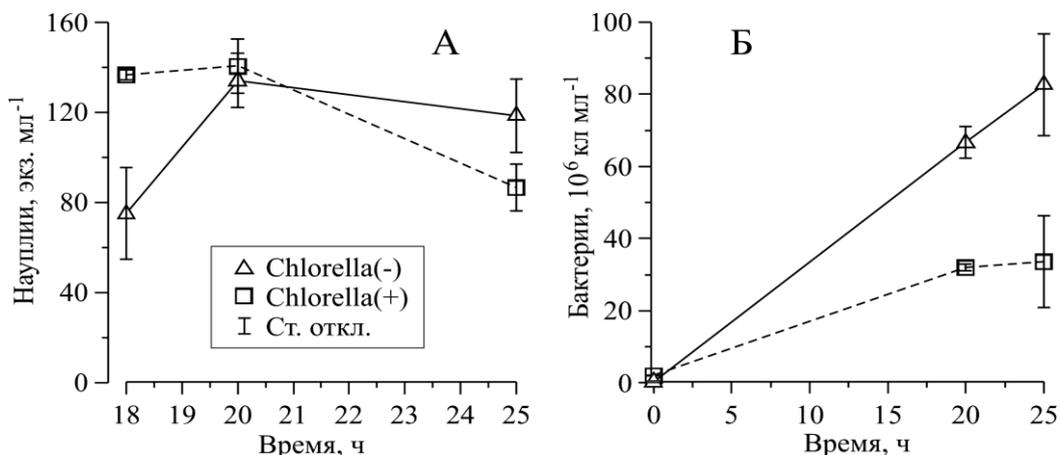


Рис 1. Динамика выклева науплиев *A. salina* (А) и численности бактерий в их среде (Б) в контроле (*Chlorella*(-)) и в сосудах с добавлением *C. vulgaris* (*Chlorella*(+))

Fig. 1 Dynamics of hatching of *A. salina* nauplii (A, ind ml⁻¹) and bacterial abundance (Б, 10⁶ cells ml⁻¹) in control (*Chlorella* (-)) and test (*Chlorella* (+)) vessels. Bars are SD. Time is in hours

В дальнейшем, на протяжении всего эксперимента, численность бактерий возрастала во всех сосудах, что было обусловлено выклевом науплиев и поступлением при разрыве цист в среду большого количества органических веществ, являющихся субстратом для бактерий. Однако в контроле бактериальное число значительно превышало таковое в опытных сосудах и на момент пика выклева науплиев (20 ч) (рис 1 А) составляло соответственно $66.7 \pm 4.4 \times 10^6$ и $31.9 \pm 0.9 \times 10^6$ кл. мл⁻¹ (рис 1 Б). После 20 ч инкубации артемий (пик выклева) рост численности бактерий в сосудах с добавлением *C. vulgaris* не только не увеличивался, а замедлился, в то время как в контрольных сосудах он продолжал увеличиваться, и в конце эксперимента численность бактерий составила, соответственно, $82.7 \pm 14 \times 10^6$

и $33.6 \pm 0.12 \times 10^6$ кл. мл⁻¹, что указывает на хорошо выраженный антибиотический эффект данного вида микроводорослей.

Добавление *C. vulgaris* в среду инкубации артемий оказывало также положительный эффект и на динамику выклева науплиев. В сосудах с добавлением *C. vulgaris* выклев начинался раньше, и уже через 18 ч численность науплиев составляла в опыте 136 ± 2 , в контроле – 75 ± 35 экз. мл⁻¹. Методами, используемыми в данном эксперименте, невозможно определить, прямой или косвенный эффект оказывает присутствие хлореллы на скорость выклева науплиев из цист. Возможно, в отсутствии микроводорослей высокая численность бактерий в среде инкубации может негативно влиять на процесс выделения специальных энзимов в головной части эмбриона, служащим сигналом

к разрыву наружных оболочек цист и освобождению науплиев [28]. Кроме того, известно, что содержание кислорода в среде в присутствии микроводорослей увеличивается, что может оказывать дополнительный положительный эффект на процесс выклева науплиев [28].

Пик выклева (максимальная численность науплиев) и в контрольных и в опытных сосудах зафиксирован через 20 ч, после чего наблюдали начало метаморфоза, – появление метанауплиев – следующей стадии развития артемии, однако скорость метаморфоза в дальнейшем различалась (рис. 1А). В опытных сосудах численность неметаморфозированных особей (науплиев) снижалась в 1.3 раза быстрее, что указывает на то, что в отсутствие хлореллы процесс метаморфоза артемии проходил значительно медленнее. Так, через 25 ч количество науплиев в контроле составляло 118 ± 16 экз. мл⁻¹, в то время как в опыте оно снизилось до 86 ± 14 экз. мл⁻¹. Таким образом, присутствие *C. vulgaris* в среде инкубации артемии не только сокращает время выклева, но и обеспечивает их более синхронный метаморфоз. Это позволяет снизить расходы на инкубацию и даёт возможность получить максимальное количество однородных организмов (определённой стадии развития), что очень важно, т.к. различным стадиям развития личинок рыб, в частности камбалы-калканы, которых кормят артемией, должны соответствовать определенные стадии развития артемии.

Во время метаморфоза происходит линька науплиев, что приводит к поступлению дополнительного количества органических веществ в среду инкубации, и, соответственно, росту бактериальной численности. Действительно, после пика выклева и начала метаморфоза в контрольных сосудах в отсутствие хлореллы численность бактерий растёт, в то время как в опытных сосудах в присутствии хлореллы изменяется незначительно (рис 1 Б). Это указывает на то, что даже в условиях поступления дополнительного субстрата для роста бактерий в среду *C. vulgaris* сохраняет свою антимикробную активность и сдерживает рост

бактерий. Антимикробный эффект хлореллы отмечен нами в предыдущих работах, в которых показано, что присутствие хлореллы в среде сдерживало рост бактерий при выклеве личинок калкана из икры [3]. Об антимикробной активности микроводорослей неоднократно сообщалось и в других публикациях [9]. Предполагают, что она может быть связана с действием метаболитов, продуцируемых клетками микроводорослей [18], или специфической бактериальной флорой, ассоциированной с культурами микроводорослей [8]. В естественной среде микроводоросли конкурируют с бактериями за пространство и ресурсы [13], что определяет способность многих видов микроводорослей к синтезу антибиотиков и хорошо выраженному ингибированию бактериального роста [1].

В ходе эксперимента установлено также, что присутствие хлореллы влияло на степень и характер колонизации покровов артемии бактериями. Окрашенная SYBR Green I бактериальная пленка на покровах науплиев артемии флуоресцировала ярко-зелёным цветом. По локализации и яркости флуоресценции определяли интенсивность бактериальной колонизации той или иной области цефалоторакса (рис. 2).

В наибольшей степени бактерии колонизировали протоцефалон и конечности науплиев (рис. 2 В), однако отдельные небольшие очаги бактериальной пленки наблюдали также и на других участках покровов их тела (рис. 2, С). Особи, наиболее интенсивно колонизированные бактериями, существенно отличались по своим средним цветовым характеристикам, в первую очередь, по яркости свечения (В) и вкладу зелёного цвета (G) в общую цветовую гамму покровов организма. Таким образом, осреднённые значения яркости окраски и её зелёной компоненты могли служить достоверным показателем степени колонизации покровов артемии бактериальной флорой среды выращивания.

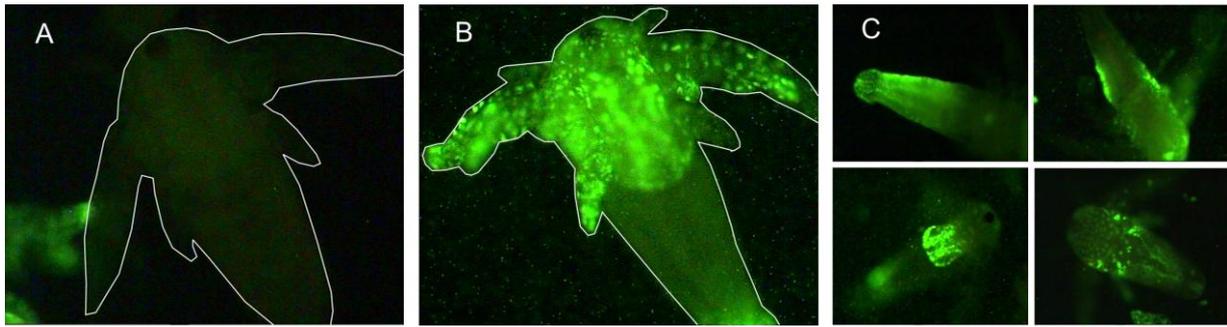


Рис. 2 Флуоресценция бактериальной пленки на покровах артемии после окраски пробы SYBR Green I: А – отсутствие бактериальной колонизации; В – сильная бактериальная колонизация головы и конечностей; С – примеры разной локализации бактерий на покровах артемии

Fig. 2 Fluorescence of bacterial film on *Artemia* integuments stained with SYBR: А – no bacterial colonization; В – intensive bacterial colonization of head and limbs; С – examples of different localization of bacterial film on *Artemia* integuments

В пробах с хлореллой (*Chlorella*(+)) степень колонизации артемии бактериями была ниже, чем в контроле (*Chlorella*(-)) (рис. 3). В пространстве переменных G и B обе пробы образуют в значительной степени перекры-

вающиеся кластеры точек (рис. 3), однако кластер контроля крупнее, поскольку он включает колонизированные бактериями организмы с ярко-зелёной флуоресценцией.

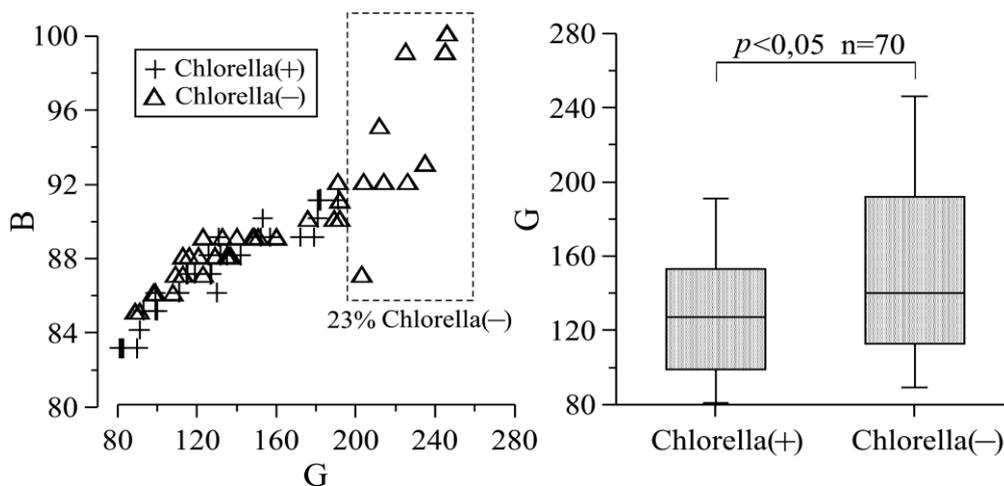


Рис. 3. Оценка степени бактериальной колонизации покровов науплиев артемии в обработанных хлореллой пробах (*Chlorella*(+)) и контроле (*Chlorella*(-)) по характеру окраски (G – зелёная компонента RGB, B – яркость в цветовой модели HSB) бактериальной биопленки флуорохромом SYBR Green I

Fig. 3 Bacterial colonization of epithelia of the *Chlorella*-treated (*Chlorella*(+)) and control (*Chlorella*(-)) *Artemia* nauplii, estimated by colour characteristics (G – green in RGB model, B – brightness in HSB model) of SYBR Green I-stained bacterial biofilm

Распределение каждой из выборок по переменной G представлено на рис. 3 в форме диаграмм Box-Whisker (медиана, диапазон изменений, верхний и нижний квартили, выбросы). Для этой переменной получена статистически достоверная разница между опытом и контролем ($p < 0.05$, непарный *t*-тест), что указывает на хорошо выраженный бактерицидный Морський екологічний журнал, № 4, Т. XII. 2013

эффект хлореллы и на возможность её использования для снижения риска передачи бактериальных патогенов через живые корма.

Характер распределения кластеров на рис. 3 позволяет сделать ряд предположений о механизме выявленного антибактериального эффекта хлореллы.

Высокие концентрации бактерий (в том

числе патогенных) в среде контроля увеличивают вероятность заражения организмов с ослабленным иммунитетом, которые всегда присутствуют в популяции (эта часть популяции, составляющая около 23 %, выделена пунктиром на рис. 3).

В целом, устойчивость организмов к бактериальной колонизации покровов и эпителия обусловлена их иммунно-физиологическим статусом [23]. Иммунная система артемии примитивна, антитела ею не вырабатываются, однако этот организм способен демонстрировать неспецифический иммунный ответ. Как показано в ряде работ [16, 27], хлорелла усиливает неспецифический иммунитет у личинок рыб и кормовых объектов аквакультуры.

Наряду с модулированием иммунитета артемии и антимикробным эффектом, описанным выше, хлорелла может оказывать ингибирующее действие на некоторые биохимические механизмы, протекающие в процессе образования биоплёнки на поверхности организмов, такие, например, как кворумная сигнализация [19]. Биоплёнки являются наиболее распространённой формой выживания микробов в агрессивной среде, и представляют собой совокупность бактерий, взаимодействующих друг с другом и с поверхностью субстрата. Они окружают себя полимерным конгломератом, состоящим из внеклеточной ДНК, белков, полисахаридов [12]. Рост биоплёнки влечёт за собой повышенную резистентность составляющих её бактерий к saniрующим воздействиям. Взаимодействие бактерий происходит посредством кворумной сигнализации, осуществляющейся с помощью вырабатываемых ими

сигнальных молекул, которые обеспечивают привлечение новых бактерий в растущую биоплёнку. Наиболее изученным типом этих сигнальных молекул является ацил-гомосерин лактон (АHL) [6]. Именно АHL регулирует фактор вирулентности бактерий. В ряде исследований установлено, что соединения, которые вырабатывают некоторые виды микроводорослей, в частности *C. vulgaris*, ингибируют выработку молекул АHL и экспрессию генов некоторых штаммов бактерий, входящих в состав биоплёнки [19], таким образом, сдерживая её формирование.

Независимо от тонких механизмов, лежащих в основе антимикробного эффекта оказываемого хлореллой, её практическое использование в борьбе с патогенными бактериями в аквакультуре представляется перспективным.

Выводы. 1. Присутствие *Chlorella vulgaris* в среде инкубации *Artemia salina* оказывало ингибирующий эффект на бактериальный рост, сопутствующий выклеву науплиев. **2.** Добавление *C. vulgaris* в среду инкубации артемий положительно влияло на динамику выклева науплиев (сокращение времени выклева) и обеспечивало более синхронный метаморфоз животных. **3.** Интенсивность обростания артемий бактериальной плёнкой в присутствии клеток *C. vulgaris* достоверно ниже. **4.** Результаты эксперимента свидетельствуют в пользу целесообразности применения хлореллы в качестве эффективного антимикробного агента, как перспективного и неременного компонента биотехнологического комплекса выращивания личинок морских рыб.

1. Алфимов Н. Н. О роли диатомовых и перидиниевых водорослей в самоочищении морских вод // Бот. журн. – 1959. – 44, № 6. – С. 68 – 72.
2. Дзицкий В. С. Компьютерная программа для оценки цветовых характеристик окрашенных зоопланктонных организмов // Понт Эвксинский: Тез. докл. VII Межд. науч.-практ. конф. мол. учён. (Севастополь, 24 – 27 мая 2011 г.). – С. 98 – 99.
3. Рауэн Т. В., Ханайченко А. Н., Муханов В. С. Влияние микроводорослей и их фильтратов на численность бактерий в среде выращивания

камбалы калкана // Морск. экол. журн. – 2011. – 10, № 3. – С. 48 – 56.

4. Alcaide E., Blasco M. D., Esteve C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms // Appl. Envir. Microbiol. – 2005. – 71. – P. 3348 – 3350.
5. Austin B., Allen D. Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*). // Aquaculture. – 1982. – 126. – P. 369 – 383.
6. Boyer M., Wisniewski-Dye F. Cell-cell signaling in bacteria: not simply a matter of quorum FEMS //

- Microbiol. Ecol. – 2009. – **70** (2). – P. 1–19.
7. Coutteau P. Microalgae / Lavens P., Sorgeloos P. (eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. – №. 361. – Rome, FAO. – 1996. – P. 10 – 13.
 8. Dopazo C. P., Lemos M. L., Lodeiros C. et al. Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens // J. Appl. Bacteriol. – 1988. – **65**. – P. 97–101.
 9. Duff D. C., Bruce D. L., Antia N. J. The antimicrobial activity in marine planktonic algae // Can. J. Microbiol. – 1966. – **12**. – P. 877 – 884.
 10. Emmerson W. D. Predation and energetics of *Penaeus indicus* (Decapoda, Penaeidae) larvae feeding on *Brachionus plicatilis* and *Artemia* nauplii // Aquaculture. – 1984. – **38**. – P. 201 – 209.
 11. Gomezgil B. R., Grobois F. A. A., Jarero J. R. et al. Chemical disinfection of *Artemia* nauplii // J. World Aquac. Soc. – 1994. – **25**. – P. 579 – 583.
 12. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – **2** (2). – P. 95 – 108.
 13. Kellam S. J., Walker J. M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture // Br. Phycol. J. – 1989. – **24**. – P. 191 – 194.
 14. Krishnika A., Ramasamy P. Effect of water exchange to eliminate *Vibrio* sp. during the naupliar development of *Artemia franciscana* // J. Fish. Aquat. Sc. – 2012. – **7**. – P. 205 – 214.
 15. Makridis P., Fjellheim J.A., Skjermo J., Vadstein O. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions // Aquaculture. – 2000. – **185**. – P. 207–218.
 16. Makridis P., Moreira C., Alves Costa R. et al. Use of microalgae bioencapsulated in *Artemia* during the weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) // Aquaculture. – 2009. – **292**. – P. 153–157.
 17. Marie D., Partensky F., Jacquet S., Vaultot D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I // Appl. Environ. Microbiol. – 1997. – **63**. – P. 186 – 193.
 18. Marshall J. A., Salas M., Oda T. Superoxide production by marine microalgae // Mar. Biol. – 2005. – **147**. – P. 533 – 540.
 19. Natrah F. M. I., Kenmegne M. M., Wiyoto W. et al. Effects of micro-algae commonly used in aquaculture on acyl-homoserine lactone quorum sensing // Aquaculture. – 2011. – **317** (4). – P. 53 – 57.
 20. Olafsen J. A. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture // Aquaculture. – 2001. – **200**. – P. 223 – 247.
 21. Olsen A. I., Olsen Y., Attramadal Y. et al. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana* // Aquaculture. – 2000. – **190**. – P. 11–25.
 22. Relf J. M., Chisholm J. R. S., Kemp G. D. et al. Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5- kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas* // Eur. J. Biochem. – 1999. – **264**. – P. 350 – 357.
 23. Rosenstiel P., Philipp E. E., Schreiber S. et al. Evolution and Function of Innate Immune Receptors – Insights from Marine Invertebrates // Innate Immun. – 2009. – **4** (1). – P. 291–300.
 24. Sahul Hameed A.S., Balasubramanian G. Antibiotic resistance in bacteria isolated from *Artemia* nauplii and efficacy of formaldehyde to control bacterial load // Aquaculture. – 2000. – **183**. – P. 195 – 205.
 25. Skjermo J., Vadstein O. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine fish larvae // Aquaculture. – 1999. – **177**. – P. 333 – 343.
 26. Sorgeloos P., Lavens P., Leger P. et al. Manual for the culture and use of brine shrimp *Artemia* in aquaculture. – The Belgian Administration for Development Cooperation FAO. – Belgium, 1986. – 319 p.
 27. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. et al. Commercial applications of microalgae // Biosci Bioeng. – 2006. – **101** (2). – P. 87 – 96.
 28. Van Stappen G. *Artemia* / Lavens P., Sorgeloos P. (eds.). Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fish. Technical Paper. – №. **361**. – Rome, FAO. – 1996. – P. 79 – 250.

Поступила 04 октября 2012 г.

После доработки 13 августа 2013 г.

Вплив мікрроводорості *Chlorella vulgaris* на динаміку виклеву *Artemia salina* і чисельності бактерій в її середовищі. Т. В. Рауен, В. С. Муханов, А. М. Ханайченко. З метою оптимізації вирощування *Artemia salina* і зниження бактеріального навантаження при її використанні в якості живого корму досліджено вплив культури мікрроводорості *Chlorella vulgaris* на швидкість виклеву наупліїв артемії, динаміку чисельності бактерій у середовищі їхнього вирощування та інтенсивність колонізації покривів наупліїв бактеріями. При

додаванні *C. vulgaris* в середу інкубації артемій чисельність бактерій в ній була значно нижчою, ніж у контролі (відповідно, $33.6 \pm 0.12 \times 10^6$ і $82.7 \pm 14 \times 10^6$ кл. мл⁻¹ через 25 ч, *t*-тест, $p < 0,05$), що вказує на добре виражений антибіотичний ефект хлорели. Надалі цей ефект зберігався навіть в умовах надходження в середу інкубації артемій великої кількості органічних речовин - додаткового субстрату для бактерій, обумовленого метаморфозом науплії, т.ч мікроводорості здатні стримувати бактеріальний ріст. Присутність *C. vulgaris* в середовищі інкубації артемій скорочувала час виклева науплій з цист і забезпечувала більш синхронний метаморфоз. У пробах з хлорелою ступінь інтенсивності колонізації покриттів наупліїв бактеріями був достовірно нижче, ніж у контролі.

Ключові слова: мікроводорості, бактерії, проточна цитометрія, *Chlorella vulgaris*, бактерицидний ефект, *Artemia salina*

Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on hatching dynamics of *Artemia salina* and the number of bacteria in its environment. T. V. Rauen, V. S. Mukhanov, A. N. Khanaychenko. In order to optimize cultivation of *Artemia salina* and reduce bacterial load of this live food the effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on the hatching rate of nauplii, dynamics of bacteria number in the cultivation medium and the intensity of bacterial colonization on nauplii integuments were studied. Addition of *C. vulgaris* to *Artemia* incubation medium reduced bacterial number significantly in comparison with control (respectively, $33.6 \pm 0.12 \times 10^6$ and $82.7 \pm 14 \times 10^6$ cells. ml⁻¹ after 25 h, *t*-test, $p < 0,05$). Results indicate well-defined antibiotic effect of *Chlorella*. Moreover, antibiotic effect persisted also during metamorphosis from nauplii to metanauplii, in presence of additional substrate for bacterial growth. Addition of *C. vulgaris* to *Artemia* incubation medium reduced the time of nauplii hatching from cysts and synchronized their metamorphosis to metanauplii. Besides, the degree of intensity of bacterial colonization of *Artemia* integuments was significantly lower in presence of *Chlorella*.

Keywords: microalgae, bacteria, flow cytometry, *Chlorella vulgaris*, antibiotic effect, *Artemia salina*