



УДК 595.18 : 591.13

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

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

## ВЛИЯНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И ИХ ФИЛЬТРАТОВ НА ЧИСЛЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ В СРЕДЕ ВЫРАЩИВАНИЯ КАМБАЛЫ КАЛКАНА

С помощью проточной цитометрии количественно исследовали влияние микроводорослей *Chlorella vulgaris*, *Platymonas viridis*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira weissflogii* и их фильтратов на рост бактерий в средах инкубации икры и выращивания личинок камбалы калкана *Psetta maxima maeoticus* на стадиях эндо- и экзогенного питания. Бактерицидный эффект *I. galbana*, о котором сообщается в ряде публикаций, обнаружен не был. Наиболее выраженным антибактериальным эффектом обладала хлорелла. Бактерицидное действие фильтрата культуры хлореллы по своей эффективности было сравнимо с действием её нефильтрованной культуры. С целью снижения численности бактерий в среде выращивания камбалы калкан добавление хлореллы целесообразно на всех стадиях развития калкана, включая стадию эндогенного питания. Присутствие хлореллы в среде выращивания может предупредить вспышку численности бактерий в момент перехода личинок на стадию экзогенного питания. Возможности и пути контроля бактериального роста на этапе смены типа питания у личинок калкана требуют дополнительных, более детальных исследований.

**Ключевые слова:** камбала калкан, микроводоросли, антимикробный эффект, проточная цитометрия

Камбала калкан, *Psetta* (= *Scophthalmus*) *maxima maeoticus* Pallas, 1814 – ценный вид черноморских промысловых рыб, запасы которого значительно снизились за последние десятилетия. Для восстановления численности этого вида, помимо регуляции вылова, необходима организация промышленного культивирования. Однако в условиях интенсивных технологий выращивания камбалы создаётся высокая плотность живых организмов, не характерная для естественной среды её обитания, что приводит к увеличению бактериальной нагрузки и, как следствие, высокой смертности личинок [5].

Традиционным решением этой проблемы являются антибиотики, однако их широкое неконтролируемое применение повлекло за собой появление резистентных форм бактерий [6] и, в результате, снижение аквакультурной продукции [11]. В настоящее время во многих странах мира проводятся исследования в поисках альтернативного решения этой проблемы [14].

Большое внимание в данном вопросе уделяют микроводорослям. В природе микроводоросли живут в богатых микроорганизмами средах и вынуждены конкурировать с бактериями за ограниченное пространство и ресурсы [13]. С этим связана

способность многих видов микроводорослей к синтезу антибиотиков и хорошо выраженному ингибированию бактериального роста [1]. Подобный эффект может проявляться и на экосистемном уровне, когда, например, массовое развитие фитопланктона ведёт к снижению численности гетеротрофных бактерий в столбе воды [3].

Внесение морских микроводорослей непосредственно в выростные марикультурные системы (технология «зелёной воды») повышает выживаемость и рост личинок [12]. Предполагают, что положительный эффект "зелёной воды" обусловлен антибактериальными и иммуностимулирующими характеристиками микроводорослей [19], а также пробиотикоподобным воздействием ассоциированной с ними микрофлоры. В ряде исследований сообщалось об антибактериальной активности клеточных лизатов или экстрактов разнообразных видов микроводорослей [21].

Важно также отметить, что некоторые морские микроводоросли продуцируют антимикробные соединения, которые устойчивы в солёной среде [18], тогда как эффективность антибиотиков в условиях высокой солёности может снижаться. Поэтому разработка методов применения микроводорослей

© Т. В. Рауэн, А. Н. Ханайченко, В. С. Муханов, 2011

в борьбе с бактериальными инфекциями в аквакультурных производствах является актуальной задачей.

В связи с этим цель данной работы заключалась в том, чтобы с помощью проточной цитометрии исследовать и количественно оценить влияние микроводорослей и их фильтратов на рост бактериальной микрофлоры в средах инкубации икры и выращивания личинок камбалы калкана на стадиях эндо- и экзогенного питания.

**Материал и методы.** В экспериментах использовали оплодотворённую икру и личинок камбалы калкана на стадиях эндо- и экзогенного питания, полученные от диких производителей (отловлены в апреле 2010 г. на шельфе Севастопольского района). Для оценки влияния микроводорослей на микрофлору в среде выращивания использовали 5 видов микроводорослей: *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890 (класс Trebouxiophyceae) и *Dunaliella salina* Teod., 1905 (класс Chlorophyceae), *Platymonas viridis* Pouch (= *Tetraselmis suecica*) (класс Prasinophyceae), *Isochrysis galbana* Parke, 1949 (класс Prymnesiophyceae), *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hasle, 1977 (класс Bacillariophyceae), маточные культуры которых получены из коллекции микроводорослей отдела физиологии водорослей ИнБИОМ НАНУ (г. Севастополь). Их культивировали на среде Уолна [10] при температуре  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , постоянном освещении 5 тыс. люкс, без продувки.

В экспериментах использовали аликвоты культур в экспоненциальной фазе роста, а также их фильтраты, приготовленные с помощью расходных материалов (47-мм нитроцеллюлозные мембраны с диаметром пор 0.2 мкм) и фильтровального оборудования Sartorius (Германия). Для исследования динамики численности микроводорослей и бактерий в экспериментальных сосудах пробы воды объёмом 1 мл отбирали в начале эксперимента и через каждые 24 ч, фиксировали их фильтрованным (<0.2 мкм) формальдегидом (конечная концентрация 2 %) и производили счёт клеток с помощью проточной цитометрии (см. ниже).

Для инкубации икры и выращивания личинок калкана в экспериментальных сосудах использовали стерильную морскую воду (СМВ), приготовленную с помощью микрофильтрации (10, 5 и 1 мкм картриджные фильтры) и обработанную ультрафиолетом. Температура воды во всех экспериментах составляла  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**Цитометрический анализ.** Для исследования динамики численности бактерий (контроль и

опыт) и микроводорослей (опыт) в экспериментальных ёмкостях применяли проточный цитометр Cytomics<sup>TM</sup> FC 500 (Beckman Coulter, США), оборудованный 488 нм однофазным аргоновым лазером, и программное обеспечение 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. На рис. 1 представлены типичные цитограммы неокрашенных и окрашенных SYBR Green I проб среды выращивания.

Окраску бактерий SYBR Green I производили в соответствии с [15]. Это флуорохром повышенной яркости с максимумами возбуждения и эмиссии, соответственно, 497 и 521 нм. Он 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  $-20^\circ\text{C}$ . 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  $\text{мин}^{-1}$ ), 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 производили с помощью калибровочных флуоросфер Flow-Check<sup>TM</sup> (Beckman Coulter) с известной концентрацией в пробе.

**Эксперимент 1** (стадия эмбрионального развития личинок калкана). В эксперименте определяли влияние смешанной культуры микроводорослей *C. vulgaris* и *P. viridis* (при концентрациях 18 и  $5 \times 10^5$  кл.  $\text{мл}^{-1}$ , соответственно, т.е. в соотношении около 4:1) на численность бактерий в среде с развивающейся икрой калкана. Предпочтение было отдано смешанной культуре в связи с тем, что,

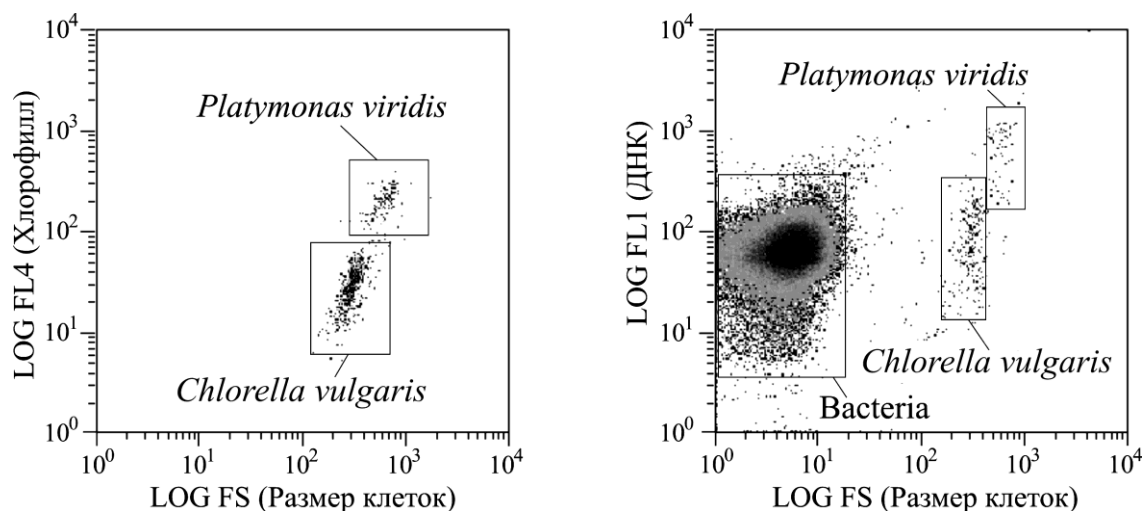


Рис. 1 Типичные цитограммы неокрашенных (слева) и окрашенных SYBR Green I (справа) проб среды выращивания калкана. Показаны кластеры бактерий и отдельных видов микроводорослей

Fig. 1 Typical cytograms of unstained (left) and stained with SYBR Green I (right) samples taken from the experimental flasks. Clusters of bacteria and particular species of microalgae are gated

как правило, эффективность роста отдельных видов в подобных устойчивых ассоциациях выше, чем в монокультурах [4]. Соответственно, можно ожидать и более выраженного антибактериального действия этих смесей. Кроме того, интересно было выяснить, как изменится баланс в соотношении видов микроводорослей в ходе эксперимента.

Перед экспериментом оплодотворённую икру на стадии бластулы промывали СМВ и помещали в экспериментальные сосуды с 500 мл (опыт) и 505 мл (контроль) СМВ. В опыте добавляли 5 мл смеси микроводорослей *C. vulgaris* и *P. viridis*. Численность икры в полученных средах составляла около 500 экз. л<sup>-1</sup>. Опыт проводили в трёх повторностях (табл. 1).

Табл. 1 Приготовление среды инкубирования икры и выращивания личинок камбалы калкана  
Table 1 Media and protocols of the experiments

	Икра/Личинки (экз. л <sup>-1</sup> )	Объём СМВ, мл	Микроводоросли (объём, мл)	Количество повторностей
<b>Эксперимент 1</b>				
Контроль	Икра (500)	505	-	3
Опыт	то же	500	<i>C. vulgaris</i> и <i>P. viridis</i> (5)	3
<b>Эксперимент 2</b>				
Контроль	Личинки <sup>1</sup> (40)	505	-	2
Опыт 1	то же	500	<i>I. galbana</i> (5)	2
Опыт 2	то же	то же	<i>D. salina</i> (5)	2
Опыт 3	то же	то же	<i>C. vulgaris</i> (5)	2
Опыт 4	то же	то же	<i>P. viridis</i> (5)	2
Опыт 5	то же	то же	<i>T. weissflogii</i> (5)	2
<b>Эксперимент 3</b>				
Контроль	Личинки <sup>2</sup> (40)	550	-	3
Опыт 1	то же	500	<i>I. galbana</i> <sup>3</sup> (50)	3
Опыт 2	то же	то же	<i>C. vulgaris</i> <sup>3</sup> (50)	3
Опыт 3	то же	то же	<i>T. weissflogii</i> <sup>3</sup> (50)	3

<sup>1</sup> – личинки до перехода на экзогенное питание; <sup>2</sup> – самостоятельно питающиеся личинки; <sup>3</sup> – фильтрат культуры (<0.2 мкм)

В ходе эксперимента смену воды и удаление отхода икры в сосудах не производили, т.к. это могло непредсказуемым образом повлиять на динамику микроорганизмов в среде и нарушить идентичность условий.

**Эксперимент 2** (эндогенно питающиеся личинки калкана). В эксперименте определяли влияние каждой из монокультур микроводорослей – *I. galbana* ( $31.1 \pm 20.7 \times 10^5$  кл. мл<sup>-1</sup>; здесь и далее указан 95% доверительный интервал), *C. vulgaris* ( $45.9 \pm 19.3 \times 10^5$  кл. мл<sup>-1</sup>), *T. weissflogii* ( $7.5 \pm 6.1 \times 10^4$  кл. мл<sup>-1</sup>), *P. viridis* ( $14.4 \pm 2.9 \times 10^5$  кл. мл<sup>-1</sup>) и *D. salina* ( $21.9 \pm 3.9 \times 10^5$  кл. мл<sup>-1</sup>), на численность бактерий в среде с личинками калкана на стадии эндогенного питания, т.е. когда питание личинок осуществлялось исключительно за счет запасов желточного мешка. Чтобы выяснить, в какой степени переход личинок на стадию экзогенного питания может повлиять на динамику численности микрофлоры в среде выращивания, дополнительная проба была отобрана через сутки после открытия рта у личинок.

В эксперименте использовали личинок калкана в возрасте одних суток. Схема приготовления экспериментальных сосудов была той же, что и в эксперименте 1 (табл. 1), но количество опытов увеличилось до пяти в соответствии с числом тестируемых видов микроводорослей. Средняя численность личинок в экспериментальных сосудах составляла 40 экз. л<sup>-1</sup>. Количество повторностей было уменьшено до двух, чтобы объём работы соответствовал производительности цитометрических измерений.

**Эксперимент 3** (экзогенно питающиеся личинки калкана). В эксперименте определяли влияние фильтратов микроводорослей трёх видов – *I. galbana*, *C. vulgaris* и *T. weissflogii* (плотности культур соответствуют указанному в эксперименте 2), на численность бактерий в среде с личинками калкана, экзогенно питающимися живым кормом – коловратками *Brachionus plicatilis* (средняя плотность – 5 экз. мл<sup>-1</sup>). Применение фильтратов культур представляет практический интерес в тех случаях, когда добавление самих микроводорослей невозможно – их внесение в среду выращивания привело бы к активному размножению питающихся ими коловраток, нежелательному изменению биохимического состава и калорийности живого корма, увеличению бактериальной нагрузки.

В эксперименте использовали личинок калкана в возрасте 7 сут. Протокол приготовления сре-

ды их выращивания в экспериментальных сосудах представлен в табл. 1. Фильтраты моновидовых культур микроводорослей готовили с помощью нитроцеллюлозных мембран с диаметром пор 0.2 мкм. В экспериментальные сосуды добавляли по 50 мл фильтрата, тогда как в контроле использовали тот же объём СМВ. Опыт проводили в трёх повторностях.

**Результаты и обсуждение. Эксперимент 1.** В начале эксперимента численность бактерий в контроле была достоверно ниже, чем в опыте с добавлением смеси микроводорослей *C. vulgaris* и *P. viridis* (рис. 2). Это можно объяснить тем, что вместе с клетками микроводорослей в среду были привнесены ассоциированные с ними бактерии, которые в норме всегда присутствуют в неаксеничных культурах микроводорослей.

В последующие дни рост численности бактерий происходил во всех сосудах, включая контроль. Однако численность бактерий в опыте оставалась достоверно ниже, чем в контроле, вплоть до выклева личинок на 5-е сутки. Это указывало на хорошо выраженный антибиотический эффект, оказываемый микроводорослями.

После выклева личинок наблюдали бурный рост бактерий, как в контроле, так и в опыте, что свидетельствовало о поступлении в среду легко усваиваемых органических веществ. При этом достоверной разницы между численностью бактерий в контроле и опыте не выявлено, т.е. антибактериальный эффект отсутствовал. Таким образом, бактерицидный эффект смеси микроводорослей *C. vulgaris* и *P. viridis* сохранялся только до выклева личинок.

Соотношение микроводорослей *C. vulgaris* и *P. viridis* по численности сохранялось постоянным (около 4:1) вплоть до выклева личинок (рис. 3). Однако поступление в среду большого количества органики и других веществ в результате выклева икры и последующий за этим бактериальный рост нарушили этот баланс, и численность *C. vulgaris* снизилась более чем в 2 раза.

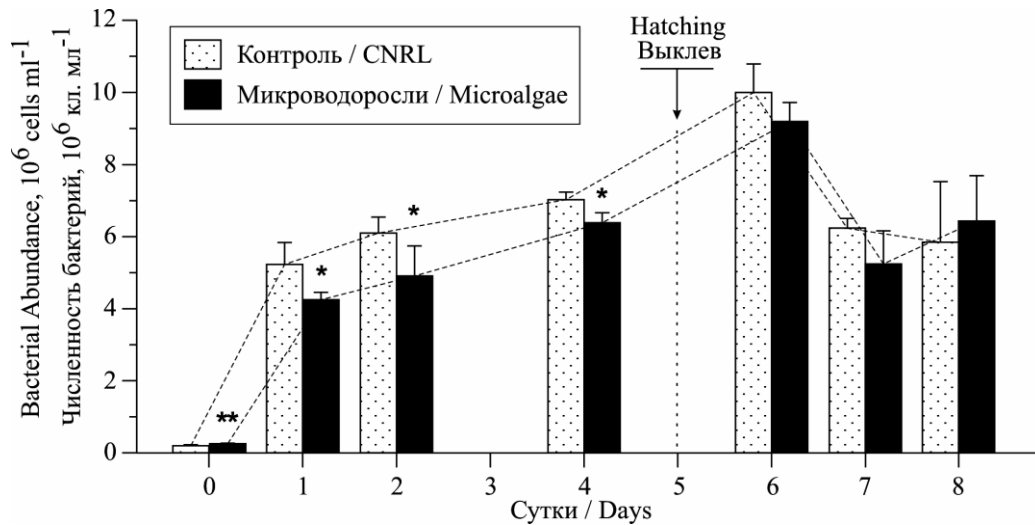


Рис. 2 Динамика бактериального роста в сосудах с икрой до и после выклева личинок (эксперимент 1). Здесь и далее показаны 95% доверительные интервалы. Одна и две звёздочки – результаты, соответственно, достоверно ( $p < 0.05$ ) ниже и выше контроля ( $t$ -тест Стьюдента)  
 Fig. 2 Dynamics of bacterial numbers over the experiment 1 before and after egg hatching. (95% confidence interval are presented here and further. Single and double stars are the values significantly (95% CI) lower and higher than the control (CNRL), respectively ( $t$ -test)

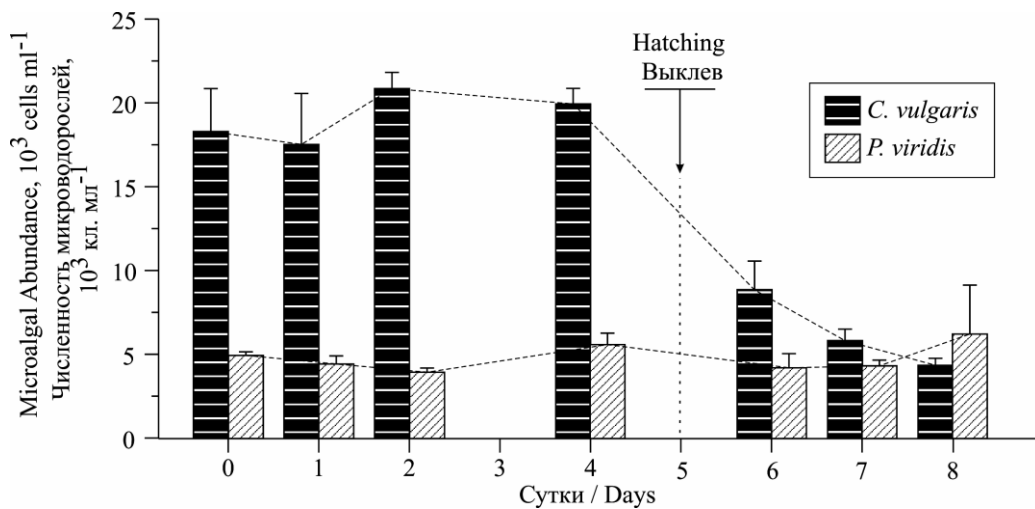


Рис.3 Динамика численности микроводорослей *C. vulgaris* и *P. viridis* в опыте (эксперимент 1)  
 Fig. 3 Dynamics of of *C. vulgaris* and *P. viridis* numbers (experiment 1)

Снижение численности микроводорослей, сопровождающее выклев личинок, по-видимому, связано с альгицидным воздействием бактерий. Известно, например, что *Pseudomonas* и *Vibrio* способны угнетать рост морских микроводорослей как в экспериментальных условиях [8], так и в естественной морской среде [16].

Можно предположить, что со снижением численности микроводорослей в среде убывал и их антибиотический эффект. Очевидно, он был связан, прежде всего, с *C. vulgaris*, поскольку хорошо прослеживалась связь динамики численности этого вида и численности бактерий.

Полученные нами свидетельства бактерицидного эффекта *C. vulgaris* согласуются с

ранее опубликованными данными. Антибактериальные субстанции, ингибирующие рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, были впервые выделены из хлореллы в 1942 г. [17]. Присутствие этой микроводоросли в среде выращивания атлантического тюрбо, близкородственного калкану вида, значительно повышает выживаемость личинок [20]. Вид *Platymonas viridis* также известен своей антибактериальной активностью [13]. Их супернатанты и экстракты способны ингибировать *in vitro* рост патогенных бактерий *Aeromonas*, *Pseudomonas* и *Vibrio* [7].

**Эксперимент 2.** Численность бактерий в контроле изменялась незначительно вплоть до

открытия личинками рта и перехода на экзогенное питание (3-е сутки) (рис. 4). В этот период питание личинок осуществлялось за счет желточного мешка, т.е. загрязнение среды продуктами метаболизма было минимальным, а бактерии были лишены дополнительных ресурсов для роста. В опыте численность бактерий превышала контроль за счет микрофлоры, привнесенной с микроводорослями. Это особенно заметно в сосудах с *D. salina* и *C. vulgaris*. Однако на следующие сутки численность бактерий в них значительно снизилась.

На 4-е сутки, после перехода личинок на стадию экзогенного питания, численность бактерий в контроле выросла. Вероятно, это

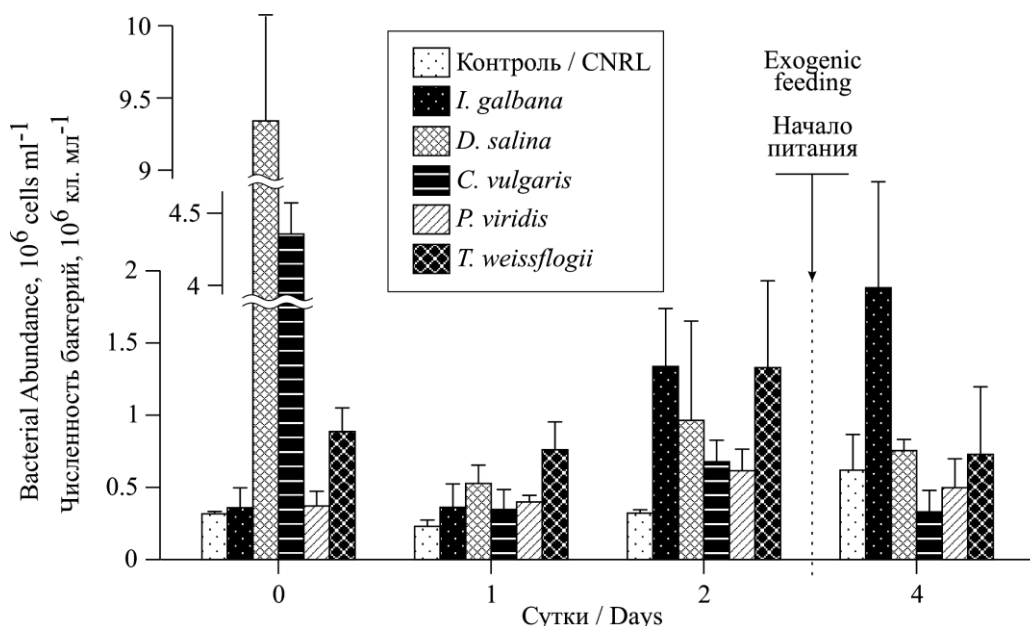


Рис. 4 Динамика численности бактерий в эксперименте 2  
Fig. 4 Bacterial dynamics over the experiment 2. CNRL is the control flask

было связано с тем, что в этот период у личинок редуцируется желточный мешок, открывается рот и анальное отверстие, через которое в среду попадают первичные выделения. Вследствие высокой вариабельности данных трудно выявить общую для всех опытов с микроводорослями тенденцию в изменении бактериальной численности на 4-е сутки эксперимента. Исключение составляет *C. vulgaris*, в сосуде с которой наблюдали достоверное снижение численности бактерий относительно контроля.

Таким образом, несмотря на низкое бактериальное число в контроле на стадии эндогенного питания личинок, добавление хлореллы в этот период представляется целесообразным, так как оно предупреждает бактериальную вспышку после перехода личинок на стадию экзогенного питания.

**Эксперимент 3.** В течение первых суток эксперимента бактериальный рост наблюдали во всех сосудах (рис. 5). Однако уже через сутки численность бактерий в опыте с

фильтратом *C. vulgaris* была достоверно ниже, чем в контроле. На вторые сутки эксперимента рост бактерий продолжался в опытных сосудах с фильтрами *I. galbana* и *T. weissflogii*, тогда как в контроле и в опыте с *C. vulgaris* численность бактерий снижалась (рис. 6). В опыте с

фильтратом *C. vulgaris* численность бактерий на вторые сутки была также достоверно ниже, чем в контроле, что свидетельствовало о хорошо выраженных бактерицидных свойствах фильтра.

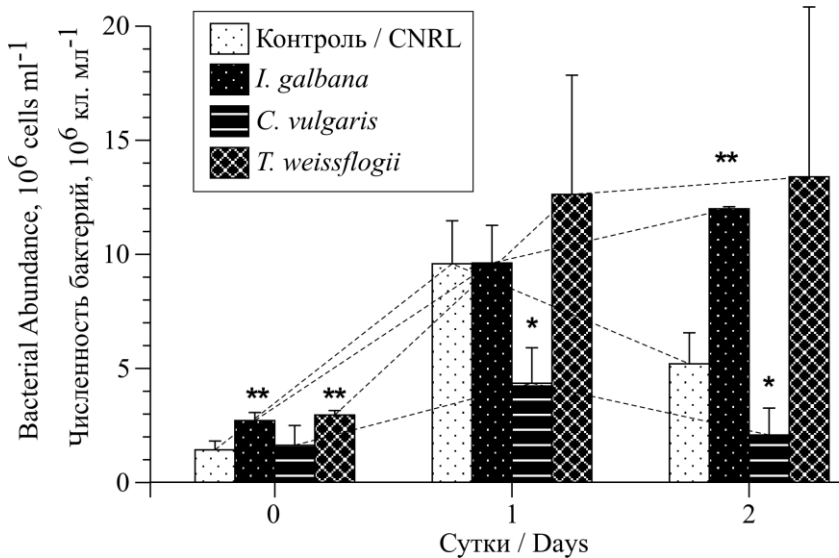


Рис. 5 Динамика численности бактерий в эксперименте 3. Одна и две звёздочки – значения, соответственно, достоверно ( $p < 0.05$ ) ниже и выше контроля ( $t$ -тест Стьюдента)

Fig. 5 Bacterial dynamics over the experiment 3. Single and double stars are the values significantly (95% CI) lower and higher than the control (CNRL), respectively ( $t$ -test)

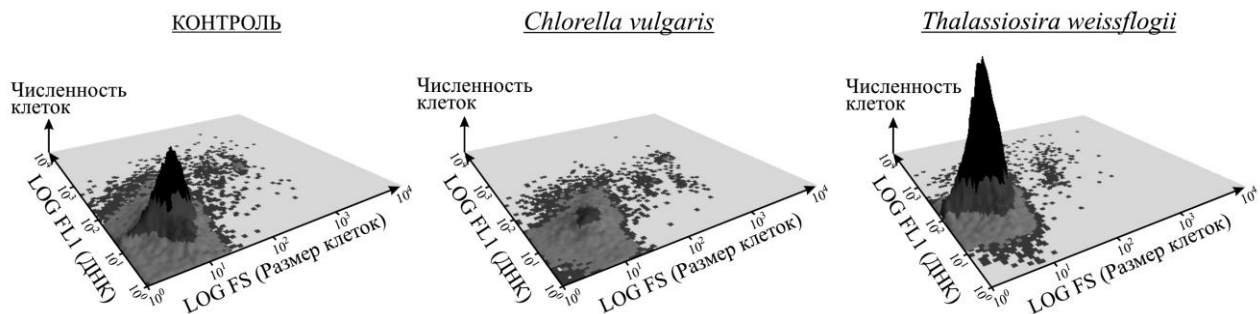


Рис. 6 Кластер бактерий в 3-мерном представлении в контроле и опытах с *C. vulgaris* и *T. weissflogii* на вторые сутки эксперимента 3

Fig. 6 3-D bacterial clusters in the control flask and the flasks with *C. vulgaris* and *T. weissflogii* on the 2<sup>nd</sup> day of the experiment 3

Бактерицидного действия *I. galbana* и *T. weissflogii*, как самих клеток, так и их фильтратов, в экспериментах не выявлено, несмотря на то, что об антибактериальном эффекте *I. galbana*, а также о бактерицидных свойствах диатомовых водорослей сообщается в ряде работ [9].

**Выводы. 1.** Из исследованных нами видов микроводорослей хорошо выраженным антибактериальным эффектом обладала только

*C. vulgaris* и её фильтрат, в то время как бактерицидный эффект *I. galbana* обнаружен не был. **2.** С целью снижения численности бактерий в среде выращивания камбалы калкан добавление *C. vulgaris* целесообразно на всех исследованных нами стадиях развития калкана. Присутствие этого вида в среде с личинками на стадии эндогенного питания может предупредить бактериальную вспышку в момент перехода личинок на стадию экзогенного питания.

3. По крайней мере, для одного из исследованных видов микроводорослей, *C. vulgaris*, показано, что бактерицидное действие фильтрата культуры по своей эффективности сравнимо с действием нефильтрованной культуры. Приго-

товление фильтрата требует дополнительных затрат времени и расходных материалов, но они оправданы тем бактерицидным эффектом, который фильтрат оказывает на стадии экзогенного питания личинок калкана.

1. Алфимов Н. Н. О роли диатомовых и перидиниевых водорослей в самоочищении морских вод // Бот. журн. – 1959. – **44**, № 6. – С. 68 – 72.
2. Вольберг М. М. Взаимодействие популяций микроводорослей и бактерий в модельной экосистеме: автореф. дисс.... канд. биол. наук. - М., МГУ, 1988. – 24 с.
3. Муравьева И. П., Гапонюк Т. О. Некоторые факторы, влияющие на самоочищение морской воды // Экология моря. – 2004. – Вып. 66. – С. 79 – 81.
4. Финенко З. З., Ланская Л. А. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды / ред. К. М. Хайлов. Экологическая физиология морских планктонных водорослей. – К.: Наук. думка, 1971. – С. 22-51.
5. Ханайченко А. Н. Микробиологические проблемы культивирования морских рыб на ранних стадиях развития (на примере камбалообразных) и пути их решения // Морск. экол. журн. – 2005. – **4**, № 2. – С. 23 – 37.
6. Alcaide E., Blasco M. D., Esteve C. Occurrence of drug-resistant bacteria in two European eel farms // Appl. and Envir. Microbiology. – 2005. – **71**, № 6. – P. 3348 – 3350.
7. Austin B., Billard E., Stobie M. S. Inhibition of bacterial fish pathogens by *Tetraselmis suecica* // J. Fish Diseases. – 1992. – **15**, 1. – P. 55 – 61.
8. Berland B. R., Bonin D. J., Maestrini S. Y. Are some bacteria toxic for marine algae? // Marine Biology. – 1972. – **12**. – P. 189 – 193.
9. Bruce D. L., Duff D. C. B. The identification of two antibacterial products of the marine planktonic algae *Isochrysis galbana* // J. Gen. Microbiol. – 1967. – **48**. – P. 293 – 298.
10. 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.
11. FAO Fishery Information, Data and Statistics Unit (FIDI) 2002, 2007. Fishery Statistical Collections. FIGIS Data Collection. FAO-, Rome. Available via FIGIS from: <http://www.fao.org/figis/>.
12. Howell B. R. Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) // Aquaculture. – 1979. – **18**. – P. 215 – 225.
13. Kellam S. J., Walker J. M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture // Br. Phycol. J. – 1989. – **24**. – P. 191 – 194.
14. Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M., Gibson L. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes // Aquaculture. – 2008. – **274**. – P. 1 – 14.
15. 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.
16. Mayali X, Azam F. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms // J. Eukaryot. Microbiol. – 2004. – **51**. – P. 139 – 144.
17. Pratt R. Studies on *Chlorella vulgaris*. V. Some properties of the growth-inhibitor formed by *Chlorella* cells // Am. J. Bot. – 1942. – **29**. – P. 142 – 148.
18. 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.
19. Sorgeloos P., Dehasque M., Dhert P. et al. Review of some aspects of marine fish larviculture // V. Culture. ICES Mar. Sci. Symp. – 1995. – **201**. – P. 138 – 142.
20. Stottrup J. G., Gravingen K., Norsker N. H. The role of different algae in the growth and survival of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) in intensive rearing systems // ICES Mar. Sci. Symp. – 1995. – **201**. – P. 173 - 186.
21. Viso A.C, Pesando D., Baby C. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture // Bot. Mar. – **30**. – P. 41 – 45.

Поступила 26 октября 2010 г.

После доработки 18 мая 2011 г.



**Вплив мікроводоростей і їх фільтратів на чисельність бактерій в середовищі вирощування камбали калкана.** Т. В. Рауен, А. М. Ханайченко, В. С. Муханов. За допомогою проточної цитометрії кількісно досліджували вплив 5 видів мікроводоростей (*Chlorella vulgaris*, *Platymonas viridis*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira weissflogii*) і їх фільтратів на зростання бактеріальної мікрофлори в середовищах інкубації ікри і вирощування личинок камбали калкан *Psetta maxima* var. *maeoticus* на стадіях ендо- і екзогенного харчування. Бактерицидний ефект *I. galbana*, про який повідомляється у ряді публікацій, не був виявлений. Найбільш виражений антибактеріальний ефект мала хлорела. Бактерицидна дія фільтрату культури хлорели за своєю ефективністю була порівняна з дією її нефільтрованої культури. З метою зниження чисельності бактерій в середовищі вирощування камбали калкан додавання хлорели доцільне на всіх стадіях розвитку калкана, включаючи стадію ендогенного харчування. Присутність хлорели в середовищі вирощування може попередити бактеріальний спалах у момент переходу личинок на стадію екзогенного харчування. Можливості та шляхи контролю бактеріального росту на етапі зміни типу харчування у личинок калкана вимагають додаткових, детальніших досліджень.

**Ключові слова:** Камбала калкан, мікроводорості, антимікробний ефект, проточна цитометрія

**Effect of microalgae and their filtrates on bacterial abundance in the rearing environment of the Black Sea turbot.** T. V. Rauen, A. N. Khanaichenko, V. S. Mukhanov. The effects of five microalgal species, *Chlorella vulgaris*, *Platymonas viridis*, *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, *Thalassiosira weissflogii*, and their filtrates on bacterial load in rearing environment of the Black Sea turbot (*Psetta maxima* var. *maeoticus*) were studied by flow cytometry. *Chlorella* proved to be the only species whose culture suspension and cell-free filtrate exhibited a significant bactericidal effect, while the well known antimicrobial properties of *I. galbana* were not revealed. *Chlorella* should be added to the rearing environment of the Black Sea turbot during embryonic and early larval development stages, including the yolk sac larvae, as it is able to prevent a bacterial outbreak during the transition period from endogenous to exogenous feeding.

**Key words:** Black Sea turbot, microalgae, green water, antimicrobial effect, flow cytometry.

## **ВЫШЛА В СВЕТ МОНОГРАФИЯ**

---

УДК 550.42

**Метановые сипы в Черном море: средообразующая и экологическая роль** / Егоров В. Н., Артемов Ю. Г., Гулин С. Б. / Под ред. Г. Г. Поликарпова. – Севастополь: НПЦ «ЭКОСИ-Гидрофизика», 2011. – 4 05 с. Ил 156. Табл 21.

В монографии изложены материалы исследований нового хемозкологического фактора – струйных газовыделений (холодных метановых сипов) со дна Черного моря. Описаны методика и математическое обеспечение гидроакустической регистрации данных и определения параметров струйных потоков. Дано географическое распределение и таблица координат локализации свыше 3000 сипов в акватории Черного моря. Представлены данные по метановым потокам с глубоководных грязевых вулканов. Предложена модель газообмена пузырьков в водной среде и даны оценки интенсивности метановой разгрузки дна и поступления метана в атмосферу. Изложены современные представления о влиянии холодных сипов на гидрохимические характеристики морской среды, вертикальный водообмен, метанотрофный хемосинтез и трофическую структуру вод. Описана новая форма жизни в аноксической водной толще Черного моря, которая представлена симбиотическим сообществом анаэробных метанооксиляющих архей и сульфатредуцирующих бактерий. Представлены данные по вертикальной зональности расположения и возрасту карбонатных бактериальных построек. Даны оценки потенциальной экологической опасности от метановой разгрузки дна Черного моря и обсуждаются перспективы использования холодных сипов как поискового и ресурсного факторов.