СУКЦЕССИЯ ТАКСОЦЕНОВ МОРСКИХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ЛАБОРАТОРНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Н.А. Андреева¹, Н.И. Копытина²

¹ Институт природно-технических систем, РФ, г. Севастополь, ул. Ленина, 28

E-mail: andreeva.54@list.ru

² Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН (ИМБИ),

РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2

E-mail: kopytina_n@mail.ru

Выявлены сукцессионные изменения в накопительных культурах фитопланктона, которые произошли в течение 4-х месяцев. Материалом для выделения культур являлись пробы морской воды из трех бухт с различной антропогенной нагрузкой, расположенных на побережье г. Севастополя (Черное море, полуостров Крым). После месяца культивирования водорослей на питательной среде было обнаружено 28 таксонов, а в конце эксперимента число таксонов уменьшилось до 13. Установлено, что в одинаковых условиях лабораторного эксперимента в течение месяца формируется сходная систематическая структура таксоценов микроводорослей, которая не зависит от срока экспозиции, места и срока отбора материала.

Ключевые слова: таксоцены микроводорослей, цианобактерии, накопительные культуры, побережье г. Севастополя, Чёрное море, полуостров Крым

Введение. При длительном культивировании образцов морской воды на питательной среде образуются накопительные культуры, которые можно получить в закрытых системах при выращивании в обычных периодических (стационарных) условиях на чашках Петри, в колбах или пробирках. Накопительное культивирование не предусматривает притока минеральных веществ и удаление органических. В процессе жизнедеятельности каждый организм изменяет среду своего обитания, потребляя часть питательных веществ и выделяя продукты метаболизма. То же происходит при более или менее длительном существовании популяций: представители одних видов меняют свое окружение в неблагоприятную сторону и в результате оказываются вытесненными популяциями других видов. Происходит сукцессия. Сукцессия (от лат. *successio* – преемственность, наследование) – процесс саморазвития сообществ. В ходе сукцессии на основе конкурентных взаимодействий видов постепенно формируются более устойчивые комбинации, толерантные к конкретным абиотическим факторам среды [1–3].

Цель работы – проследить сукцессионные изменения в сообществах (таксоценах) фитопланктона, полученных из образцов морской воды трех бухт, расположенных на побережье г. Севастополя (Черное море, полуостров Крым), в

процессе длительного лабораторного культивирования на питательной среде.

Материалы и методы. Материалом для выделения накопительных культур водорослей служили пробы воды из прибрежной мелководной зоны Карантинной, Мартыновой и Артиллерийской бухт, различающихся по степени антропогенного воздействия (рис. 1).

Карантинная бухта расположена у входа в Севастопольскую бухту и имеет открытый водообмен с морем, в неё поступают аварийный выпуск неочищенных бытовых стоков, выпуск сточных вод ливневой канализации, также в акватории бухты расположена база военных катеров и яхт, поэтому она относится к наиболее загрязненным бухтам г. Севастополя. Свидетельством загрязнения вод служат высокие концентрации нитратного (от 2 до 436 мкг/л) и органического азота (от 103 до 17000 мкг/л). Сброс ливневой канализации в бухту приводит к повышению их концентрации [4, 5].

Мартынова бухта находится перед южным заградительным молом перед выходом из Севастопольской бухты. В водоеме нет прямых источников загрязнения, но выпуски ливневых стоков из городского коллектора осуществляются в соседнюю Карантинную бухту. В результате этого загрязнители попадают и в акваторию Мартыновой бухты.

Рис. 1. Карта-схема отбора проб
1 – Карантинная бухта; 2 – Мартынова бухта; 3 – Артиллерийская бухта
(карта бухт г. Севастополя взята с сайта
http://img0.liveinternet.ru/images/attach/c/0//48/143/48143269_buhtuy_Sevastopolya.jpg)

Однако, обновление вод происходит достаточно интенсивно за счет водообмена с прилегающей частью моря. Об этом свидетельствуют данные наблюдений и модельных расчетов, полученных для данного района в различные годы после строительства мола на входе в Севастопольскую бухту [6].

В Артиллерийской бухте находятся ливневый сток, паромный причал и пристань для катеров. Из-за интенсивного судоходства Артиллерийская бухта – вторая по загрязненности в г. Севастополе (табл. 1).

Таблица 1. Средние значения гидрохимических показателей в поверхностном слое воды севастопольских бухт (1998 – 2005 гг.) [4, 5, 7]

Бухты	БПК ₅ , мг/л	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	NH ₄ ⁺	N _{орг}
		мкг/л			
Карантинная	0,74–0,96	2	35–116	8	507–552
Мартынова	0,77–0,88	2	47–57	8–9	359–554
Артиллерийская	—*	0,28–70,84	67,2–351,4 (1974)	0–119	—

* – нет данных

Образцы воды отбирали ежемесячно с апреля 2016 г. по апрель 2017 г. включительно (за исключением июля, ноября, и декабря). Всего было исследовано 30 образцов.

По 1 мл пробы воды вносили в пробирки с 10 мл жидкой модифицированной среды Громова № 6, которая является универсальной средой для культивирования водорослей [8] и имеет следующий состав: KNO₃ – 1,0 г; K₂HPO₄ – 0,2 г; MgSO₄ · 7H₂O – 0,2 г; CaCl₂ – 0,15 г; NaHCO₃ – 0,2 г; раствор микроэлементов – 1 мл; вода морская – 1000 мл. *Состав раствора микроэлементов:* ZnSO₄ · 7H₂O – 0,22 г; MnSO₄ – 1,81 г; CuSO₄ · 5H₂O –

0,079 г; NaBO₃ · 4H₂O – 2,63 г; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O – 1,0 г; FeSO₄ · 7H₂O – 9,3 г; Co(NO₃)₂ · H₂O – 0,02 г; трилон Б – 10,0 г; вода дистиллированная – 1000 мл.

Водоросли выращивали в течение 4 месяцев при комнатной температуре и постоянном искусственном освещении светодиодными лампами (LED серия PALAZZO) в специально оборудованном шкафу. Первичное микроскопическое изучение прижизненных препаратов микроводорослей проводили через 1 месяц инкубации, затем культуры изучали ежемесячно до истечения срока экспозиции. Препарат помещали на предметное

стекло и исследовали с использованием микроскопа МИКМЕД-1 при увеличении $\times 400$. Фотографирование объектов осуществляли при помощи цифровой фотокамерой CANON Power Shot A1100 IS с дальнейшей обработкой изображений в программе Adobe Photoshop CS3 Extended. Таксономическую принадлежность микроводорослей устанавливали при помощи определителей [9–12].

Анализ материала выполнен с использованием пакета статистических прикладных программ PRIMER® 5.2.8. [13].

Результаты и обсуждение. Водоросли идентифицировали до рода, но авторам не удалось установить систематическую принадлежность нескольких таксонов диатомовых водорослей, цианобактерий, зеленых нитчатых водорослей, гантелевидных и лентообразных организмов. Поэтому при описании структуры сообществ фитопланктона были использованы термины таксон и таксоцен. Всего за время эксперимента было выявлено 28 таксонов.

После экспозиции материала в течение месяца в накопительных культурах водорослей были обнаружены 28 таксонов: цианобактерий – 9 родов, диатомовых водорослей – 12, зеленых водорослей – 5 (одноклеточных и нитчатых), а также гантелевидные и лентообразные организмы. По частоте встречаемости доминировали представители диатомовых водорослей из родов *Navicula* – 60,0, *Cylindrotheca* – 50,0, *Pinnularia* – 33,3 и зеленые нитчатые – 33,3%. Водоросли из

родов *Amphipleura*, *Coelastrum*, *Chaetoceros*, *Coscinodiscus*, *Cymbella*, *Eunotia* также были обнаружены, но только в этот период культивирования.

Со временем, в некоторых вариантах эксперимента культуры водорослей начали погибать. К концу второго месяца организмы фитопланктона не были обнаружены в двух пробах, через месяц еще в одной, а к концу экспозиции в – 8 (26,7% случаев).

С увеличением времени инкубации частота встречаемости доминирующих родов постепенно снижалась: *Navicula* – 40,0; 20,0 и 3,3%, *Cylindrotheca* – 30,0; 23,3 и 0%, *Pinnularia* – 16,7; 3,3 и 0%, зеленые нитчатые водоросли – 16,7; 16,7 и 20,0% соответственно по истечению 2, 3 и 4 месяцев. К завершению 4-го месяца число таксонов уменьшилось до 13: цианобактерий – до 6 родов, диатомовых водорослей – до 3, зеленых – до 2, также присутствовали гантелевидные и лентообразные организмы. Наибольшей частотой встречаемости отличались цианобактерии – 43,3, зеленые нитчатые водоросли и гантелевидные организмы, отмеченные в 16,7% проб.

По времени культивирования таксономическое сходство сообществ микроводорослей по коэффициенту Брея-Кёртиса изменялось от 61,9% (1 ↔ 4 месяцы) до 82,4% (2 ↔ 3).

На рис. 2 представлены некоторые микроводоросли и цианобактерии, выделенные из образцов воды после месяца культивирования.

1 – *Talassiosira*; 2 – *Amphora*; 3 – *Navicula*+*Cylindrotheca*; 4 – *Cylindrotheca*; 5 – *Pinnularia*; 6 – *Melosira*; 7, 8 – *Enteromorpha*; 9 – *Microcystis*; 10 – представители порядка Oscillatoriales

Рис. 2. Микроводоросли в образцах морской воды после 1-го месяца культивирования на питательной среде

Выявлено, что по месяцам отбора проб число таксонов в смешанной культуре, изменялось от 7 (март) до 15 (апрель, июнь). Систематическое сходство таксоценов варьировало от 36,4% (март ↔ апрель) до 81,8% (май ↔ сентябрь).

В Карантинной бухте было обнаружено 19 таксонов, в Мартыновой – 20, в Артиллерийской – 16. После экспозиции материала в течение месяца в смешанных культурах водорослей из Карантинной и Мартыновой бухт было обнаружено по 19 таксонов, а в Артиллерийской – 15. В бухтах доминировали одинаковые роды водорослей, но с разной частотой встречаемости: диатомовые *Navicula* в 60,0; 80,0 и 60,0%, *Cylindrotheca* в 90,0; 40,0 и 70,0%, *Pinnularia* в 50,0; 50,0 и 30,0%, зеленые *Tetraselmis* в 50,0; 70,0 и 50,0%, а зеленые нитчатые в 50,0; 40,0 и 40,0% проб в Карантинной, Мартыновой и Артиллерийской бухтах соответственно. В Артиллерийской бухте отмечено минимальное число таксонов *Cyanobacteria* (4 из 9). Сходство систематического состава таксоценов бухт изменялось от 52,9 (Мартынова ↔ Артиллерийская) до 73,7% (Мартынова ↔ Карантинная), 9 таксонов были общими.

На последнем этапе культивирования число таксонов в Карантинной бухте снизилось до 4, в Мартыновой – до 8, а в Артиллерийской – до 6. Во всех культурах из Мартыновой бухты рост наблюдался до конца экспозиции, а в Карантинной и Артиллерийской водоросли отсутствовали в трех и пяти культурах, соответственно. В пробах из Карантинной бухты наиболее часто встречались цианобактерии – 30,0%, зеленые нитчатые водоросли и гантелевидные организмы по 20,0%; в Мартыновой – цианобактерии – 60,0% и гантелевидные организмы – 20,0%, а в Артиллерийской – зеленые нитчатые – 20,0%. Сходство систематического состава таксоценов бухт после 4-месячной экспозиции составляло 14,3% (Мартынова ↔ Артиллерийская), 20,0% (Карантинная ↔ Артиллерийская) и 50,0% (Мартынова ↔ Карантинная). По завершению эксперимента в образцах из Артиллерийской бухты представители цианобактерий отсутствовали.

На разных этапах культивирования наибольшее сходство структуры таксоценов выявлено в Карантинной и Мартыновой бухтах, что, вероятно, обусловлено их смежным расположением.

По результатам исследования проведена оценка статистической достоверности различий систематической структуры таксоценов (ANOSIM-тест) по срокам инкубации, по месяцам отбора проб первичного материала и по бухтам, в которых отбирались пробы. Усредненные коэффициенты корреляции при уровне значимости 0,1% составили: $R = 0,226$ (по срокам экспозиции), $R = 0,115$ (по месяцу отбора проб), $R = 0,071$ (по бухтам). Значения коэффициентов указывают на отсутствие достоверных различий систематической структуры таксоценов накопительных культур, выращенных в одинаковых условиях.

По-видимому, после месяца экспозиции проб воды из акваторий с различной антропогенной нагрузкой, в культуральной среде формируются сходные условия, благоприятные для доминирования нескольких родов диатомовых (*Navicula*, *Cylindrotheca*, *Tetraselmis*, *Pinnularia*) и зеленых нитчатых водорослей. При дальнейшем культивировании, когда среда обогащалась органическим веществом за счет неизбежного отмирания части клеток водорослей, многие фототрофы могли частично или полностью перейти на гетеротрофное питание [14], что привело к смене доминирующих форм в таксоценох. В результате сукцессий доминирующими компонентами таксоценов стали представители *Cyanobacteria*, а также зеленые нитчатые водоросли и гантелевидные организмы. Следовательно, при длительном культивировании образцов природных вод на жидкой модифицированной среде Громова № 6 можно получить исходный материал для выделения перечисленных организмов в чистую культуру.

В ходе исследований были впервые обнаружены несколько представителей цианобактерий из родов *Chroococcidiopsis*, *Nodularia*, *Westiellopsis*, *Gloeotrichia*, а также неидентифицированные формы, которые мы ранее не регистрировали в фитопланктоне прибрежной акватории крымского побережья Черного моря (рис. 3).

1, 2 – *Microcystis*; 3 – *Chroococcidiopsis*; 4–6 – *Oscillatoriales*; 7 – *Nodularia*; 8 – *Westiellopsis*; 9 – неидентифицированная форма; 10 – *Gloeotrichia*

Рис. 3. Цианобактерии в образцах морской воды после 3-4 месяцев культивирования на питательной среде

Заключение. В процессе длительного лабораторного культивирования водорослей из образцов морской воды происходит последовательная закономерная смена одного биологического сообщества другим (сукцессия), что характерно и для природной среды. Модели подобного типа могут быть полезны при изучении особенностей роста и развития таксонов водорослей и отдельных их представителей. Экстраполяция полученных данных поможет спрогнозировать биологическое разнообразие и пути самовосстановления морской прибрежной экосистемы в целом.

Полученные смешанные культуры цианобактерий могут служить материалом для выделения альгологически чистых штаммов, которые в дальнейшем войдут в авторскую коллекцию. Такие коллекции имеют огромное научное и прикладное значение, в качестве «банка» хранения генофонда организмов и как объекты для проведения различных лабораторных исследований.

Работы выполнены:

– по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2016-0005 "Фундаментальные и прикладные исследования закономерностей и механизмов формирования региональных изменений природной среды и климата под влиянием глобальных процессов в системе океан-атмосфера-криосфера и антропогенного воздей-

ствия", руководитель направления – д.г.н. Воскресенская Е.Н.;

– по госбюджетной теме ИМБИ РАН № 0828-2018-0004 «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса. Раздел Комплексный экологический мониторинг прибрежных вод Крымского побережья в местах базирования биотехнологических комплексов с целью оценки современного состояния и прогноза качества водной среды и донных отложений по гидролого-гидрохимическим и гидробиологическим характеристикам. Разработка новых технологий получения биологически активных веществ из морских гидробионтов, руководитель направления – д.б.н. Рябушко В.И.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций Минск.: БГУ, 2004. 78 с.
2. Левич А.П., Личман Е.Г. Модельное изучение возможностей направленного изменения структуры фитопланктонных сообществ http://www.chronos.msu.ru/old/RREPORTS/levich_model_izuch/levich_model_izuch.htm (дата обращения: 18.08.2017).
3. Экологические сукцессии

<http://www.grandars.ru/shkola/geografiya/sukcessiya.html> (дата обращения: 31.10.2017).

4. *Гидрохимическая характеристика отдельных бухт севастопольского взморья* / Е.А. Куфтаркова, Н.Ю. Родионова, В.И. Губанов // Труды ЮГНИРО, 2008, Т. 46. С. 110–117.

5. *Куфтаркова Е.А., Субботин А.А., Родионова Н.Ю.* Оценка влияния мидийной фермы на гидрохимические условия района ее функционирования (Севастопольская бухта, Черное море) // Гидробиол. журн. 2009. Т. 45, № 1. С. 110–120.

6. *Экологические условия выращивания мидий в Севастопольской бухте* / Е.А. Куфтаркова, А.А. Субботин, Н.Ю. Родионова [и др.] // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа: сб. науч. тр. / НАН Украины, МГИ, ИГН, ОФ ИнБЮМ. Севастополь, 2007. Вып. 15. С. 434–442.

7. *Сезонные особенности гидролого-гидрохимической структуры вод Севастопольской бухты, микропланктон и распределение его биохимических компонент (Черное море, наблюдения 2004–2005 гг.)* / А.С. Лопухин, Е.И. Овсяный, А.С. Романов [и др.] // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. Вып. 15. С. 74–109.

8. *Водоросли.* Справочник / С.П. Вассер, Н.В. Кондратьева, Н.П. Масюк [и др.]. Киев: Наук. думка, 1989. 608 с.

9. *Кондратьева Н.В.* Синьозелені водорості – Суанophyta. Ч. 2. Клас Гормогонієві – Hormogoniophyceae: в кн. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. Київ: Наукова думка, 1968. Вип. 1. 523 с.

10. *Кондратьева Н.В., Коваленко О.В., Приходькова Л.П.* Синьозелені водорості – Суанophyta. Загальна характеристика синьозелених водоростей – Суанophyta. Клас Хроококові – Chroococcophyta. Клас Хамесифонові – Chamaesiphonophyceae: в кн. Визначник прісноводних водоростей Української РСР. Київ: Наукова думка, 1984. Вип. 1. 388 с.

11. *Гусятков Н.Е., Загордонец О.А., Герасимюк В.П.* Атлас диатомовых водорослей бентоса северо-западной части Черного моря и прилегающих водоемов. Киев: Наукова думка, 1992. 110 с.

12. *Определитель бактерий Берджи* / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уильямса. М.: Мир, 1997. Т. 1–2. 799 с.

13. *Warwick R.M., Clarke K.R.* Practical measures of marine biodiversity based on relatedness of species // Oceanography and Marine Biology: an Annual Review. 2001. № 39. P. 207–231.

14. *Гольдин Е.Б.* Массовые виды цианобактерий и микроводорослей в экосистемах: межвидовые взаимоотношения и ко-эволюционный процесс // Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2012. Вып. 7. С. 111–125.

SUSSESSES OF MARINE MICROALGAE TAXOCENES DURING LONG-TERM LABORATORY CULTIVATION

N.A. Andreeva¹, N.I. Kopytina²

¹ Institute of Natural and Technical Systems, Russian Federation, Sevastopol, Lenin St., 28

² The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, Russian Federation, Sevastopol, Nakhimov Av., 2

Succession changes in accumulative cultures of phytoplankton, which occurred within 4 months, were revealed. The material for the isolation of cultures was samples of sea water from three bays with various anthropogenic loads located on the Sevastopol coast (the Black Sea, the Crimea peninsula). After a month of cultivation of algae on the nutrient medium, 28 taxa were found, and at the end of the experiment the number of taxa decreased to 13. It was found that in the same conditions of the laboratory experiment within a month a similar systematic structure of microalgae taxocenoses was formed, and it did not depend on the exposure time, place and time of material selection.

Keywords: microalgae taxocenoses, cyanobacteria, accumulative cultures, coastal water area of Sevastopol, the Black Sea, Crimea peninsula