

БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ,  
БИОТЕХНОЛОГИЯ И АКВАКУЛЬТУРА

УДК 582.232:579.8.042.083.13

DOI: [10.21072/eco.2024.09.3.06](https://doi.org/10.21072/eco.2024.09.3.06)

СОПУТСТВУЮЩАЯ МИКРОБИОТА КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA (SPIRULINA)*  
*PLATENSIS* В УСЛОВИЯХ СМЕНЫ ЛИМИТИРУЮЩИХ ФАКТОРОВ \*

Рылькова О. А., Дорошенко Ю. В., Лелеков А. С., Харчук И. А.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

г. Севастополь, Российская Федерация,

e-mail: [a.lelekov@ibss.su](mailto:a.lelekov@ibss.su)

**Аннотация:** В природных и в лабораторных условиях цианобактерии и микроводоросли сосуществуют с микробными сообществами, которые могут оказывать стимулирующее или ингибирующее воздействие на физиологию, рост и развитие альгокультур. Для оценки бактериальной контаминации и определения доли сопутствующей микробиоты в культуре *A. platensis* изучены количественный состав, разнообразие физиологических групп и морфологической структуры бактериального ассоциата в различных фазах роста накопительной и проточной культур цианобактерий. В работе использованы стандартные методы исследований накопления биомассы *A. platensis*, микробиологический, микроскопический и цитометрический подходы при исследовании сопутствующей микробиоты. Показано, что численность гетеротрофов, по данным проточной цитометрии, после окраски флуорохромом SYBR Green ( $0,3 \cdot 10^8$ – $1,6 \cdot 10^8$  кл.·мл<sup>-1</sup>) превышала значения, полученные при посевах на твёрдых средах ( $5 \cdot 10^6$ – $1,3 \cdot 10^8$  КОЕ·мл<sup>-1</sup>). Динамика изменений количественных показателей, полученная этими методами, была схожая: минимальные величины получены в экспоненциальной, а максимальные — в первой стационарной фазе роста. Проточная цитометрия значительно упрощала учёт бактериального ассоциата, однако при работе с культурой *A. platensis* необходима предварительная физико-химическая пробоподготовка. При минимальных количествах бактерий-спутников наблюдали как разнообразие физиологических групп, так и морфотипов сопутствующих микроорганизмов. На I стационарной стадии, на фоне высокой численности, при максимальном рН (11,8) доминировали алкалофильные микроорганизмы (98,8 %), представленные палочковидными бактериями различной длины (87 %). Развитие остальных физиологических групп, вероятно, ингибировалось высокой щёлочностью среды. На этапе II стационара, на фоне некоторого снижения рН и численности микробиоты, алкалофильная микробиота продолжала доминировать (82 %), однако возрастал (до 16 %) вклад дрожжей и грибов. Таким образом, рН культуральной среды при выращивании спирулины в значительной мере определяет и численность, и разнообразие бактериального сообщества. Несмотря на небольшой вклад, ассоциированная микрофлора может оказывать влияние на качество получаемой биомассы низших фототрофов при их промышленном выращивании. Проведённые исследования позволяют дать рекомендации по режимам культивирования и сбора биомассы *A. platensis*.

**Ключевые слова:** накопительная культура, продуктивность, лимитирующие факторы, бактерии, численность, физиологические группы, морфологическая структура, сопутствующая микробиота, ассоциированная микробиота

\*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Комплексное исследование экологических и физиолого-биохимических особенностей микроводорослей различных таксономических групп при адаптации к меняющимся условиям среды» (№ гос. регистрации 124021300070-2). Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Изучение биогеохимических закономерностей радиоэкологических и хемозоологических процессов в экосистемах водоемов Азово-Черноморского бассейна в сравнении с другими акваториями Мирового океана и отдельными водными экосистемами их водосборных бассейнов для обеспечения устойчивого развития на южных морях России» (№ гос. регистрации 124030100127-7).

## Введение

Цианобактерии, иногда называемые цианофитами или сине-зелёными водорослями, представляют собой большой и разнообразный тип фотолитотрофных прокариотических микроорганизмов, которые повсеместно распространены в пресной и морской воде. Некоторые виды вырабатывают токсины, а чрезмерный рост этих микроорганизмов в водоёмах представляет опасность для здоровья людей и животных. Другие виды можно собирать в качестве источника пищи или пищевой добавки — практика, известная как минимум с 16 века [Lafarga et al., 2020].

Микроводоросли используются для производства различных продуктов, таких как биотопливо, фармацевтические препараты, сырьё для аквакультуры [Azarpour et al., 2022; Borowitzka, 2013], а также для очистки сточных вод [Qin et al., 2024]. Сегодня двумя наиболее важными родами низших фототрофов, которые выращивают для потребления человеком и животными, являются цианобактерия *Arthrospira* и эукариотическая одноклеточная зелёная водоросль *Chlorella* [Muys et al., 2019]. Род *Arthrospira* насчитывает около тридцати пяти видов, из которых два, *A. platensis* и *A. maxima*, являются наиболее важными для коммерческого производства [Lafarga et al., 2020]. Среди широких слоёв населения оба вида известны как «спирулина». В биомассе спирулины содержится до 70 % белка, 10 % липидов, 13 % углеводов, 4 % нуклеиновых кислот, около 10 % составляет зольный остаток. Спирулина содержит практически все водо- и жирорастворимые витамины: В1 (тиамин), В2 (рибофлавин), В3 (пантотеновая кислота), В6 (пиридоксин), Вс (фолиевая кислота), С (аскорбиновая кислота), Е (токоферол), Н (биотин), РР (никотиновая кислота), инозит. Большинство (74 %) всех жирных кислот спирулины (пальмитолеиновая, олеиновая, линолевая, линоленовая) — ненасыщенные. Среди насыщенных жирных кислот преобладают лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, маргариновая и стеариновая. Следует отметить, что в спирулине отсутствуют жирные кислоты, не усваиваемые организмом человека. В биомассе данной цианобактерии — 20 минеральных элементов, необходимых человеку, в том числе кальций, железо, магний, медь, йод и селен, в основном в форме органических соединений. Углеводы спирулины представлены главным образом сложными полимерами. Полисахариды входят в состав клеток, клеточных стенок и слизистых чехлов. При этом преобладают гемицеллюлозы и пектиновые вещества. Полисахариды, выделенные из клеток спирулины, содержат рамнозу, фруктозу, галактозу, ксилозу, маннозу, глюкуроновую и галактуроновую кислоты [Комиссарова, Икромова, 2020].

Как и в случае с сельскохозяйственными культурами, при работе с культурой низших фототрофов существует вероятность снижения скорости роста или качества биомассы вследствие бактериальной контаминации. В закрытых биореакторах в лабораторных условиях её появление возможно исключить или контролировать его с помощью тех или иных методов. Однако в системах открытых бассейнов или фотобиореакторов, используемых в промышленной альготехнологии, вероятность появления других микроорганизмов существенно повышается [Flynn, Kenny, Mitra, 2017]. Существует несколько возможных вариантов: заражение другими видами микроводорослей [Smith et al., 2005], инфекции, вызванные вирусами [Chroeder et al., 2003], бактериями и грибами [Strittmatter et al., 2016; AlSulaiman, 2011], и появление простейших или зоопланктона [Flynn, Kenny, Mitra, 2017].

Однако даже в отсутствие заражения культуры цианобактерий и микроводорослей, как в природных, так и в лабораторных условиях, обитают в окружении сложных микробных сообществ, которые оказывают стимулирующее или ингибирующее воздействие на физиологию, рост и развитие популяций водорослей. Существующий спектр взаимоотношений в альгобактериальном сообществе чрезвычайно широк и многообразен [Гольдин, 2013; Кублановская, 2019]. Важную роль при формировании альгобактериального сообщества и регулировании взаимоотношений

между его членами играют метаболиты, выделяемые водорослями и бактериями-спутниками в процессе своей жизнедеятельности [Игнатенко, Немцева, 2012]. Проведённые таксономические исследования бактерий-спутников для ряда видов водорослей показали, что во всех случаях гетеротрофный компонент альгобактериальных сообществ представлен несколькими видами микроорганизмов. Как правило, в ассоциации с водорослью обнаруживаются от 7 до 12 видов. Установлено, что одни из них прочно связаны ценотическими взаимодействиями с водорослью и являются постоянными (доминантными) её симбионтами, другие же входят в состав альгобактериального сообщества в качестве минорного компонента [Борисова, 1996; Игнатенко, Немцева, 2012]. Кроме того, в литературе [Борисова, 1996] приводятся сведения о том, что в процессе роста и развития культуры микроводорослей наблюдается естественная смена доминирующих бактерий-спутников. Однако данные о количественных и структурных изменениях в сопутствующей микробиоте *Arthrospira platensis*, выращиваемой в условиях интенсивной культуры, крайне ограничены. На сегодняшний день хорошо проработаны вопросы влияния различных факторов среды на продуктивность культуры низших фототрофов [Лелеков, 2023]. В частности, показано, что по характеру накопительной кривой можно определить лимитирующие факторы роста культуры и последовательность их действия. В процессе роста культуры обычно происходит смена лимитирующего фактора, что выражается в резком изменении продуктивности или продукции одного из биохимических компонентов биомассы, а также в «изломах» кривой роста. Очевидно, что различные типы лимитирования оказывают влияние на фотобиосинтез микроводорослей, что изменяет состав экскретируемых ими метаболитов. В неблагоприятных условиях клетки микроводорослей и цианобактерий утолщают оболочку и агглютинируют благодаря выделению во внешнюю среду экзополисахаридов. Все эти процессы естественным образом влияют на развитие сопутствующей бактериальной составляющей. Поэтому первым шагом в исследовании развития альгобактериальных сообществ в искусственных экосистемах является получение первичных данных о численности и разнообразии гетеротрофной составляющей с учётом различных типов лимитирования роста культуры микроводорослей.

Цель работы — определить общую численность, численность различных физиологических групп, изучить морфологическую структуру сопутствующей микробиоты цианобактерии *Arthrospira platensis* в различных фазах роста накопительной и проточной культуры.

## Материалы и методы

**Условия культивирования.** Культура *Arthrospira (Spirulina) platensis* Gomont была получена из коллекции ФИЦ ИнБЮМ. Культивирование осуществляли на среде Заррук [Zarrouk, 1966] в 1-литровом культиваторе плоскопараллельного типа в условиях круглосуточного одностороннего освещения люминесцентными лампами Philips Daylight мощностью 18 Вт. Средняя освещённость рабочей поверхности составляла 6,5 клк, что с учётом спектра лампы составляет 21 Вт·м<sup>-2</sup> или 98 мкмоль квантов м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>. Суспензию барботировали воздухом с помощью аквариумного компрессора, углекислый газ не добавляли. Температуру в эксперименте поддерживали на уровне (27 ± 1) °С. Сухое вещество (биомассу) определяли оптическим методом, измеряя в 1-сантиметровых кюветах на фотометре Unicо-2100 поглощение суспензии при 750 нм, полученное значение оптической плотности умножали на эмпирический коэффициент 0,58 [Чекушкин, Авсиян, Лелеков, 2022]. На рН-метре И-160 Ми определяли рН культуральной среды.

**Метод мониторинга микрофлоры.** Для микробиологического мониторинга сопутствующих микроорганизмов пробы (5 мл) отбирали стерильными пипетками в стерильные пробирки и в течение 30 мин производили посев на твёрдые среды (ПТС). Учёт гетеротрофных бактерий (ГБРПА) проводили на рыбопептонном агаре (РПА), учёт дрожжей и грибов (ДГ) — на среде

Сабуро [Практикум ... , 2005]. Для выявления алкалофильных бактерий (АБ) использовали среду следующего состава (г·л<sup>-1</sup>): сахароза — 10, пептон — 5, дрожжевой экстракт — 5, КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> — 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 2, Na<sub>2</sub>СО<sub>3</sub> — 20, агар-агар — 20 [Хаддад и др., 1990]. Посевы производили методом Голда в объёме 40 мкл в двух повторностях. Чашки Петри инкубировали 24–48 ч при 37 °С (термостат ТС-80М, Украина). Колонии просматривали с помощью лупы и проводили подсчёт колоний образующих единиц (КОЕ) по стандартной методике [Родина, 1965].

**Подготовка суспензии *A. platensis* для цитометрических и микроскопических исследований.** Для минимизирования внешнего загрязнения все реактивы, используемые для обработки суспензии цианобактерий, фильтровались через фильтр с размером пор 0,2 мкм. Для дальнейшей работы использовали стерильные пробирки типа Ерпендорфф объёмом 15 и 2 мл. Аликвоту суспензии *A. platensis* (5–10 мл) фиксировали глутардиальдегидом в конечной концентрации 2,5 % и хранили в холодильнике при +4 °С не более двух недель.

**Обработка суспензии *A. platensis* метанолом.** В связи с тем, что трихомы спирулины могут достигать в длину 500 мкм, непосредственные исследования культуральной суспензии с помощью проточной цитометрии (ПЦ) невозможны, поэтому мы проводили предварительную физико-химическую обработку пробы. В пробирку с фиксированной *A. platensis* добавляли метанол до конечной концентрации в пробе 10 % и перемешивали 10–15 сек с помощью вортекса (Microspin FV-2400, Biosan, Латвия). Затем образцы выдерживали в ультразвуковой (УЗ) установке (Unitra unima 01SZTYN UM-4, VA140, V220, Hz50) в течение 15 мин при 35 °С, вновь перемешивали и центрифугировали (5 мин, 3000 об·мин<sup>-1</sup>) [Kallmeyer et al., 2008; Lunau et al., 2005]. Аликвоту супернатанта (старт) окрашивали флуорохромом и исследовали с помощью проточного цитометра, для осадка выполняли серию промывок (см. ниже).

**Серия промывочных процедур.** Для более полного высвобождения оставшихся микроорганизмов от трихом цианобактерий ко всему объёму осадка (после отбора аликвоты для начального определения численности (старт)) добавляли 1 мл стерильной среды Заррук, ресуспендировали с помощью вортекса и вновь центрифугировали 5 мин при 3000 об·мин<sup>-1</sup>. Аликвоту супернатанта окрашивали флуорохромом (SYBR Green I) и определяли численность бактерий с помощью проточного цитометра. Процедуру промывок повторяли от 3 до 10 раз.

**Цитометрические исследования.** Цитометрический анализ проб проводили в центре коллективного пользования «Спектрометрия и хроматография» Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН» на проточном цитометре MACS Quant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия), оборудованном тремя лазерами (405, 488, 635 нм). 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 флуорохромом SYBR Green I проводили в соответствии с протоколами [Marie et al., 1997; Noble, Fuhrman, 1998]. Рабочие растворы флуорохромов готовили из расчёта 10 мкл на 1 мл стерильной Milli-Q воды и хранили при температуре –20 °С. Образцы прокрашивали с добавлением 10 мкл рабочего раствора на 1 мл пробы с последующей инкубацией в темноте в течение 40 мин непосредственно перед цитометрическими измерениями. Для обработки данных использовали программу FSC Express 7 Research Edition.

**Расчёт численности бактерий по данным ПЦ.** При расчётах общей численности бактерий учитывали объёмы растворов — фиксатора, вводимых реактивов. Численности микроорганизмов на старте и после промывочных серий суммировали. По полученным данным строили кумулятивные кривые, за 100 % десорбированных из суспензии *A. platensis* клеток принимали результаты, полученные после 10 промывок.

**Микроскопические исследования.** При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) аликвоту (0,5–1 мл) *A. platensis* из надосадочной жидкости после химической и физической обработки пробы концентрировали на трековой мембране с диаметром пор 0,2 мкм (производства ОИЯИ, г. Дубна, Россия). Далее проводили дегидратацию, используя серию разведения этанола: 20, 30, 50, 75, 96, 100 % [Bratbak, 1993]. Для сушки образцов в критической точке (1,5–2,5 часа) применяли устройство Leica EM CPD300 (Германия), а для напыления (Au/Pd; 0,5–1,0 мин) — прибор Leica EM ACE200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония) при увеличении  $\times 4000$ – $10000$ .

**Морфологические исследования, определение размеров клеток и расчёт биомассы бактерий.** Размеры бактерий (по микрофотографиям СЭМ) определяли с помощью программы ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, США, Java 1.6.0\_20 (32-bit)). Всего по СЭМ-изображениям измерено 275 клеток, определён вклад каждой из морфологических групп в общую численность. Расчёт биомассы был проведён с учётом численности бактерий (по данным ПЦ) и коэффициента  $2,0 \cdot 10^{-14}$  г С-кл.<sup>-1</sup> [Lee, Furman, 1987].

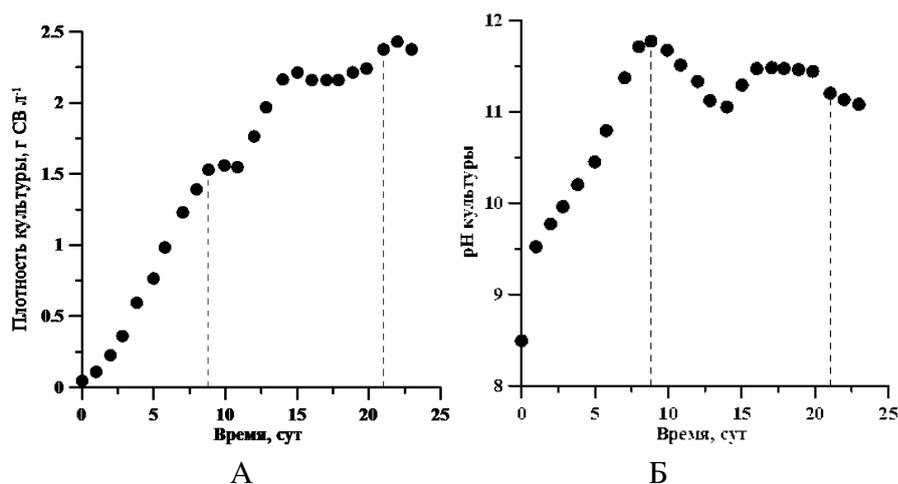
**Статистический анализ** проводили в пакете STATISTICA (data analysis software system), версия 10 (StatSoft Inc., www.statsoft.com), построение графиков — в программах SigmaPlot 10.0 (SYSTAT Software Inc.), Surfer 11 (Golden Software Inc.) и Grapher 8 (Golden Software Inc.). Полученные данные обработаны с использованием параметрических критериев, данные представлены в виде средней арифметической (M) из пяти повторностей (n), стандартной ошибки и среднего (mM); статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента ( $p < 0,05$ ).

## Результаты и обсуждение

### Влияние лимитирующих факторов на рост культуры *A. platensis* в накопительном и полупроточном режимах.

На начальном этапе эксперимента культуру *A. platensis* выращивали в накопительном режиме. На рисунке 1 представлена кривая роста и динамика рН культуральной среды. За девять суток биомасса увеличилась в 30 раз, достигнув максимального значения  $1,55$  г СВ л<sup>-1</sup> в первой стационарной фазе. Отметим, что первые трое суток наблюдался экспоненциальный рост с максимальной удельной скоростью роста  $0,65$  сут<sup>-1</sup>. На третьи сутки, в связи с самозатенением клеток, экспоненциальный рост прекратился, культура перешла в фазу линейного роста, при этом максимальная продуктивность составила  $0,2$  г СВ л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>.

Анализируя рисунок 1Б, можно заметить, что на шестые сутки эксперимента наблюдалось увеличение скорости роста рН культуры, что свидетельствует о смене лимитирующего фактора (со светового на углеродное обеспечение). Строго говоря, углерод является одним из ключевых факторов, определяющих форму кривой роста спирулины. Без дополнительной подачи углекислого газа в культуру единственным источником углерода являются гидрокарбонат-ионы. Из-за высокого начального содержания соды в питательной среде Заррук именно поглощение гидрокарбонат-ионов клетками определяет динамику рН в накопительной культуре. При высоких значениях рН среды ( $> 11,7$ ) углерод представлен в растворе только карбонат-ионами [Куприянова, Самылина, 2015], которые не поглощаются клетками спирулины. Это приводит к остановке роста культуры, что и произошло в нашем случае на девятые сутки эксперимента. Поскольку рост культуры остановился на  $1,5$  г СВ л<sup>-1</sup>, а среда Заррук по основным биогенным элементам (углерод, азот, фосфор и др.) рассчитана примерно на  $4,5$  г СВ л<sup>-1</sup>, то в среде осталось более половины всех питательных веществ.



**Рис. 1.** Накопительная кривая роста (А) и динамика рН (Б) культуры *A. platensis*. Пунктирные линии показывают точки отбора микробиологических проб

В стационарной фазе роста рН культуральной среды достигал максимума, далее показатель снижался, что привело к смещению карбонатного равновесия в среде и появлению доступного гидрокарбонатного углерода. Это отразилось на динамике плотности культуры. Начиная с 11-х по 14-е сутки возобновился интенсивный линейный рост биомассы, при этом продуктивность культуры на данном участке, как и на первом линейном участке, составила  $0,2 \text{ г СВ л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ . Это свидетельствует об обратном переключении лимитирующего фактора (с углеродного на световое обеспечение). Подробно механизмы, лежащие в основе линейного роста культуры, приведены в [Лелеков, 2023]. Рост биомассы привёл к повторному защелачиванию среды, рН культуры на 16-е сутки достиг 11,5 единиц, культура вышла на новый стационарный уровень. Максимальное значение биомассы во второй стационарной фазе составило  $2,43 \text{ г СВ л}^{-1}$ .

Видовой состав сопутствующей микробиоты при культивировании спирулины довольно хорошо изучен и описан во многих работах [Борисова, 1996; Тархова, 2005]. Однако авторы рассматривают культуру, находящуюся в стационарной фазе роста, которая характеризуется высокими значениями рН культуральной среды, при которых рост спирулины лимитирован углеродом. В литературе не приводятся данные о численности и разнообразии гетеротрофов при экспоненциальном (неограниченном) росте спирулины. Отметим, что такой рост накопительной культуры возможен только на начальном этапе, когда световые условия и обеспеченность биогенными элементами находятся на оптимальном уровне. При запуске накопительной культуры сопутствующая микробиота будет во многом определяться теми видами, которые попали в фотобиореактор вместе с инокулятом, то есть во многом зависит от предыстории. Охарактеризовать бактериальную составляющую, сопутствующую спирулине при экспоненциальном росте, возможно только в условиях проточной (полупроточной) культуры.

На рисунке 2 представлена кривая роста *A. platensis* на протоке. Культуру в течение недели держали на 50%-ном обмене: ежедневно отбирали 500 мл суспензии и добавляли такой же объём питательной среды. В таких условиях плотность культуры находилась в диапазоне около  $0,2\text{--}0,4 \text{ г СВ л}^{-1}$ , рН культуральной среды — 9,2–9,6 единиц. Известно, что на протоке происходит селекция альгобактериального сообщества, то есть можно считать, что в культуре остаются микроорганизмы, являющиеся собственно спутниками спирулины при оптимальных условиях роста. Поэтому на восьмые сутки проточного культивирования были проведены количественный и качественный анализ бактериальной микробиоты, а также сравнение полученных результатов со стационарной фазой роста.

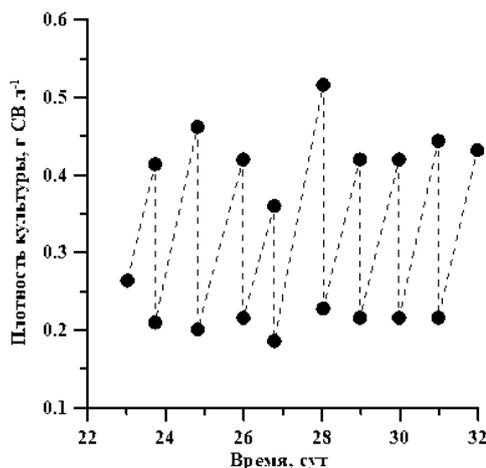


Рис. 2. Кривая роста полупроточной культуры *A. platensis*

### Численность и морфологическая структура сопутствующей микробиоты в культуре *A. platensis* в различных фазах роста.

Численность и морфоструктуру сопутствующей микробиоты культуры *A. platensis* определяли в условиях протока, а также на девятые и двадцать первые сутки эксперимента, что соответствует экспоненциальному (неограниченному) росту и двум максимумам биомассы на накопительной кривой. Согласно данным микробиологических посевов количество КОЕ увеличилось в 20 раз на первом стационаре по сравнению с экспоненциально растущей культурой (см. рисунок 3). Минимальные величины были получены в период экспоненциальной фазы роста спирулины ( $0,3 \cdot 10^8$  кл.·мл<sup>-1</sup> и  $5 \cdot 10^6$  КОЕ·мл<sup>-1</sup> для ПЦ и ПТС соответственно). Известно, что в этой фазе роста биомасса *A. platensis* растёт в условиях отсутствия лимитирования по минеральному питанию и свету. В экспоненциальной фазе роста более 70 % экскретируемых альгокультурами веществ представлены низкомолекулярными соединениями, которые могут реутилизироваться самими микроводорослями, поэтому стимулирования роста бактерий-спутников не происходит [Игнатенко, Немцева, 2012]. Кроме того, выделяемые метаболиты фототрофов могут оказывать лимитирующее, бактериостатическое или бактерицидное воздействие на ассоциированную микробиоту [Дудниченко, 1999].

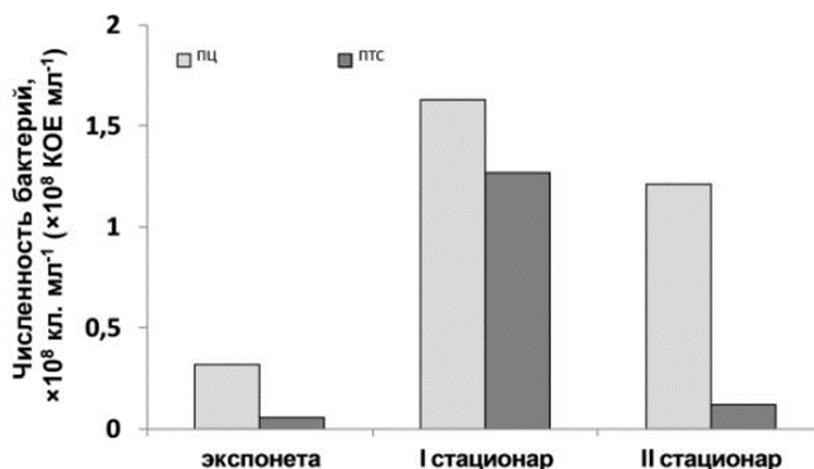


Рис. 3. Численность сопутствующей микробиоты на разных стадиях роста культуры *A. Platensis*, по данным проточной цитометрии (ПЦ) и микробиологических посевов на твёрдые среды (ПТС).

На I стационарной стадии роста *A. platensis* численность микробиоты значительно повышалась и достигала максимальных величин ( $1,6 \cdot 10^8$  кл.·мл<sup>-1</sup> и  $1,3 \cdot 10^8$  КОЕ·мл<sup>-1</sup> для ПЦ и ПТС соответственно). Согласно литературным данным, в стационарной фазе роста в культуральных средах присутствует большое количество высокомолекулярных соединений (ВМС), которые не могут усваиваться непосредственно микроводорослями. Происходит стимулирование активного развития сопутствующих бактерий, экзоферменты которых способны расщеплять ВМС до низкомолекулярных веществ [Тиберкевич, Сакевич, 1999]. В период II стационарной фазы роста *A. platensis* численность микроорганизмов несколько снижалась, но оставалась на достаточно высоком уровне ( $1,2 \cdot 10^8$  кл.·мл<sup>-1</sup> и  $0,1 \cdot 10^8$  КОЕ·мл<sup>-1</sup> для ПЦ и ПТС соответственно). Необходимо отметить, что численность ассоциированных микроорганизмов, определённая различными методами (посевы на твёрдые среды и проточная цитометрия), имела схожую тенденцию. Однако обращает на себя внимание, что при ПТС численность была ниже, это вполне согласуется с известными из литературы данными о том, что к росту на твёрдых средах способны не все микроорганизмы [Zobell, 1943].

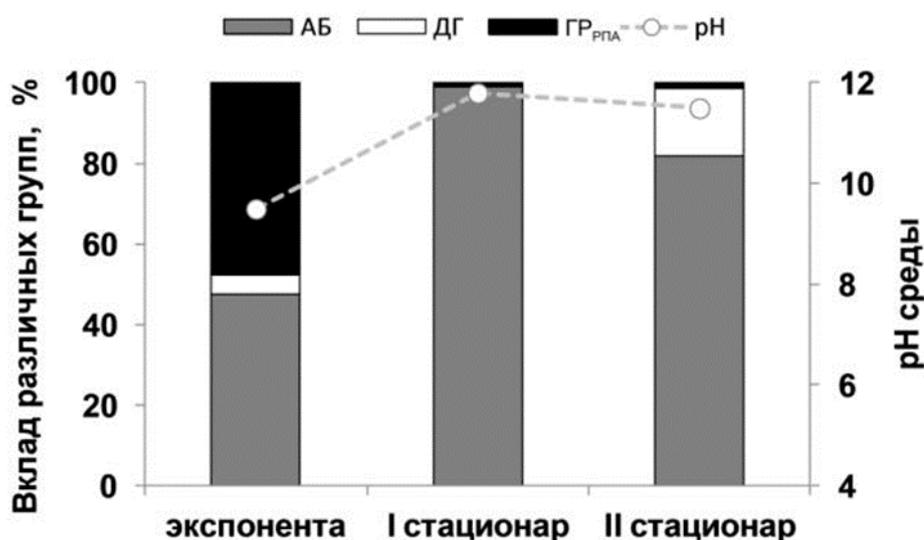
Полученные нами данные по численности бактериального ассоциата *A. platensis* несколько превышают известные аналогичные показатели:  $3 \cdot 10^4$ – $6 \cdot 10^5$  КОЕ·мл<sup>-1</sup> для методов ПТС и  $2,1 \cdot 10^6$ – $1,3 \cdot 10^7$  кл.·мл<sup>-1</sup> при окраске флуорохромами и подсчёте с помощью люминесцентной микроскопии [Тархова, 2005; Хаддад и др., 1990; Falquet, Hurni, 2006; Wu, Pond, 1981; Shiraishi, 2015]. Вероятно, это можно объяснить различием исследованных штаммов цианобактерий, условиями культивирования, а также использованием нами проточной цитометрии, как более точного метода учёта микроорганизмов. Рост общего количества сопутствующей микробиоты при накопительном выращивании *A. platensis* мог быть связан с накоплением в культуральной среде органических веществ, которые поступают при их экскреции клетками спирулины, гибели клеток, потере клеточных структур при делении и пр. Кроме того, при проточном культивировании происходит вымывание из культиватора продуктов метаболизма клеток. Однако на бактериальное сообщество существенное влияние могут оказывать и физико-химические условия среды [Shiraishi, 2015].

#### **Вклад различных физиологических групп в общую численность бактериального ассоциата в культуре *A. platensis*.**

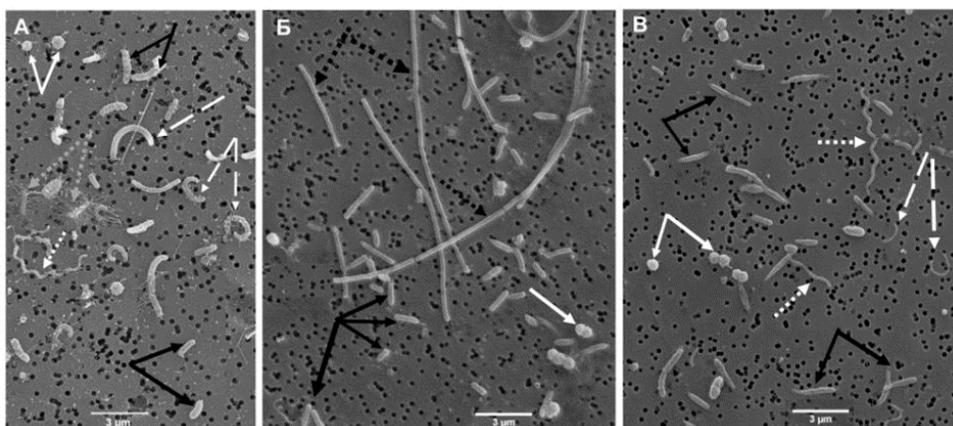
По данным посевов на твёрдые среды был определён вклад каждой физиологической группы ассоциированных микроорганизмов. На стадии экспоненциального роста соотношение вкладов ГБРПА и алкалитических бактерий был одинаковым — по 47,6 %, доля дрожжей и грибов составляла 4,8 %. На стационарных стадиях выявлено абсолютное доминирование АБ (98,8 и 82 % соответственно для I и II стационаров); доля ГБРПА была невелика (1 и 1,6 % соответственно для I и II стационаров); доля ДГ на II стационарной стадии составляла 16,2 %, что значительно превышает величину, полученную в экспоненциальной и I стационарной фазе.

Обнаружена высокая положительная корреляция ( $R^2 = 0,98$ ) между вкладом доминирующих алкалофильных микроорганизмов и уровнем рН культуральной среды. Максимальный вклад АБ (98,8 %) наблюдали в I стационарной фазе роста спирулины при максимальном значении рН = 11,8. Высокая щёлочность оказывала ингибирующее воздействие на развитие дрожжей и грибов, растущих на среде Сабуро, и особенно гетеротрофных микроорганизмов, предпочитающих рыбопептонный агар.

**Морфологическая структура сопутствующей микробиоты в культуре *A. platensis* в различных фазах роста.** В морфологической структуре микробиоты, ассоциированной с культурой *A. platensis*, по данным СЭМ, нами выделены 3 основные группы: палочковидные, округлые и извитые формы (см. рис. 5).



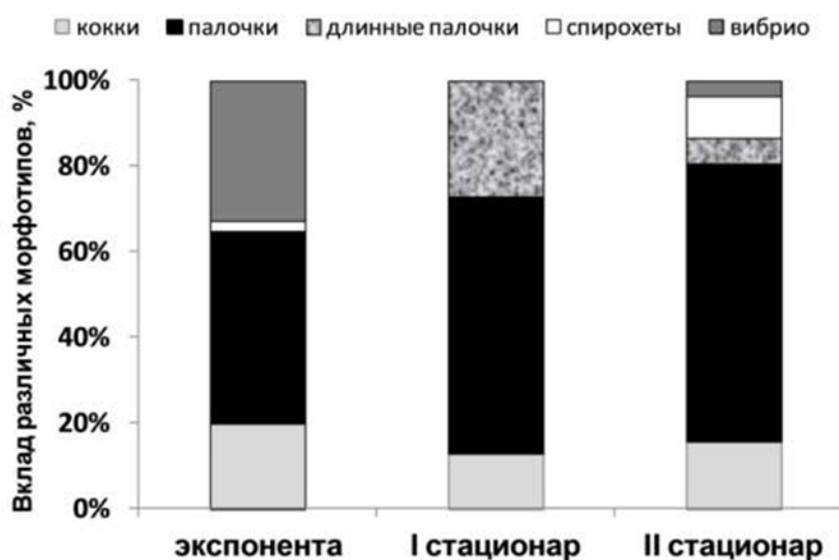
**Рис. 4.** Соотношение физиологических групп сопутствующей микробиоты на фоне изменения pH культуральной среды на разных стадиях роста культуры *A. Platensis*, по данным микробиологических посевов (АБ — алкалитические бактерии, ДГ — дрожжи и грибы, ГБРПА — гетеротрофные бактерии, растущие на РПА)



**Рис. 5.** Морфологические группы микроорганизмов, сопутствующих культуре *A. platensis* на разных стадиях роста (по данным СЭМ, увеличение  $\times 4000$ , микроскоп Hitachi SU3500 (Япония)): А — экспонента, Б — I стационар, В — II стационар. Чёрными сплошными стрелками показаны небольшие палочки, чёрными пунктирными — длинные палочки, белыми сплошными — кокки и диплококки, белыми пунктирными — спирохеты, белыми штриховыми — вибрионы, серыми штриховыми — палочки с пиллями

Во всех пробах чаще всего регистрировали небольшие палочки (часто снабжённые пиллями) длиной от 0,94 до 1,72 мкм (в среднем  $(1,30 \pm 0,17)$  мкм), шириной 0,25–0,01 мкм (в среднем  $(0,25 \pm 0,01)$  мкм). Также встречались длинные палочки длиной от 3,65 до 6,55 мкм (в среднем  $(5,13 \pm 0,87)$  мкм), шириной 0,19–0,38 мкм (в среднем  $(0,28 \pm 0,07)$  мкм). Диаметр округлых форм (кокков) изменялся от 0,47 до 0,53 мкм (в среднем составляя  $(0,5 \pm 0,02)$  мкм). Извитые формы были представлены спирохетами длиной 6,03–6,35 мкм (в среднем  $(6,19 \pm 0,03)$  мкм), шириной 0,18–0,25 мкм (в среднем  $(6,22 \pm 0,07)$  мкм) и вибрионами, имеющими вид запятых, длиной 1,4–2,71 мкм (в среднем  $(1,95 \pm 0,67)$  мкм), шириной 0,09–0,10 мкм (в среднем  $(0,1 \pm 0,002)$  мкм).

В экспоненциальной фазе роста культуры *A. platensis* доминирующей группой в ассоциированной микробиоте были небольшие палочковидные клетки (45 % от общего числа микроорганизмов). Достаточно часто встречались извитые формы, представленные вибрио (33 %), реже спирохетами (2 %). Вклад округлых форм составлял 20 %. К I стационарной фазе роста произошло перераспределение в составе сопутствующих бактерий. Доминировали также небольшие палочки, но их вклад заметно увеличился (до 60 %). Появились длинные палочковидные клетки, иногда соединённые в цепочки (27 %), несколько снизилась доля кокков (до 13 %), извитые формы отсутствовали. На II стационарной стадии роста продолжали доминировать небольшие палочковидные клетки (65 %), снизилась доля длинных палочек (до 6 %), вклад округлых клеток немного увеличился (до 15,5 %). Вновь были обнаружены извитые формы бактерий — реже вибрио (7 %), чаще спирохеты (10 %) (см. рис. 6).



**Рис. 6.** Морфологические показатели сопутствующей микрофлоры в культуре *A. platensis* на разных стадиях роста, по данным сканирующей электронной микроскопии

Известно, что в «молодых» культурах микроводорослей встречается максимальное количество видов сопутствующей микрофлоры, однако по мере роста культуры состав бактериального ассоциата становится более однородным. Это, как правило, связано с негативным воздействием продуктов распада старых клеток водорослей, действием высокого окислительно-восстановительного потенциала и, возможно, другими причинами [Gorobets, Blinkova, Batur, 2001]. В данном эксперименте в экспоненциальной фазе роста цианопрокариоты *A. platensis* при минимальных количествах бактерий-спутников наблюдали как разнообразие физиологических групп (рис. 4), так и морфотипов сопутствующих микроорганизмов (рис. 5, 6). На I стационарной стадии на фоне высокой численности, вероятно, основным лимитирующим фактором развития бактериального ассоциата стал водородный показатель культуральной среды. При максимальной  $pH = 11,8$  доминировали алкалофильные микроорганизмы (98,8 %), представленные палочковидными бактериями различной длины (их суммарный вклад составил 87 %). Развитие остальных физиологических групп (ДГ, ГБРПА), вероятно, ингибировалось высокой щёлочностью среды. На этапе II стационара на фоне некоторого снижения  $pH$  и численности микробиоты алкалофильная микробиота продолжала доминировать (82 %), однако возрастал вклад дрожжей и грибов, растущих на среде Сабуро (до 16 %, максимум для всего периода исследований). Морфологическая структура ассоциата была максимально

разнообразна. Предполагается, что помимо воздействия щёлочности среды, за счёт большого количества выделенных клетками *A. platensis* метаболитов, изменился состав органического субстрата, что вызвало смену сопутствующей микрофлоры. Однако данная гипотеза требует дополнительных исследований.

#### **Соотношение биомасс культуры *A. platensis* и сопутствующей микробиоты на различных стадиях роста.**

Согласно данным проточной цитометрии, с учётом известных коэффициентов [Lee, Furman, 1987; Троицкий, Сорокин, 1967], в экспоненциальной фазе роста биомасса бактерий, ассоциированных с *A. platensis*, составляла  $1,16 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  на  $0,43 \text{ г СВ}$  спирулины на литр или  $0,27 \%$ . (табл. 1).

Таблица 1

**Биомасса бактерий, ассоциированных с культурой *A. platensis***

Стадия роста культуры	Численность бактерий, $10^8 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1}$	Бактериальный углерод, $\text{мг С} \cdot \text{л}^{-1}$	Сырая биомасса бактерий, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$	Сухая биомасса бактерий, $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$
Экспоненциальная	0,3	0,64	5,82	1,16
I стационар	1,6	3,24	29,45	5,89
II стационар	1,2	2,42	22,00	4,40

В I стационарной фазе вклад бактерий достиг  $5,89 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  на  $1,55 \text{ г СВ} \cdot \text{л}^{-1}$  или  $0,38 \%$ , а во II стационарной фазе —  $0,18 \%$ . Таким образом, биомасса бактерий на всей накопительной кривой была ничтожно мала по сравнению с биомассой спирулины. Следовательно, сопутствующая микробиота не оказывала существенного влияния на продукционные характеристики культуры *A. platensis*.

#### **Заключение**

В ходе данной работы были получены первичные данные о численности, биомассе, морфологической структуре, физиологических группах гетеротрофов, сопутствующих спирулине при её накопительном культивировании. Впервые сделана попытка исследования альгобактериального сообщества с учётом действия лимитирующих факторов. Установлено, что рН культуральной среды при выращивании спирулины в значительной мере определяет численность и разнообразие бактериального сообщества. Полученные данные необходимы для разработки алгоритмов управления структурой и продуктивностью замкнутых альгобактериальных сообществ. С практической точки зрения гетеротрофная составляющая оказывает влияние на качество получаемой биомассы низших фототрофов при их промышленном выращивании.

С методической точки зрения в данной работе установлено, что численность ассоциированных микроорганизмов, определённая различными методами, имела схожую динамику. Проточная цитометрия значительно упрощает исследования сопутствующей микробиоты, однако при работе с культурой *A. platensis* необходима физико-химическая пробоподготовка.

### Список литературы

1. Борисова Е. В. Видовой состав бактерий, сопутствующий микроводорослям в культуре (Обзор литературы) // Альгология. – 1996. – Т. 6, № 3. – С. 303–313.
2. Гольдин Е. Б. Биологическая активность микроводорослей и ее значение в межвидовых взаимоотношениях // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2013. – Вып. 9. – С. 49–76.
3. Дудниченко Т. И. Изучение взаимоотношений *Haematococcus pluvialis* Flotow et Wille (*Chlorophyta*) и сопутствующих бактерий // Альгология. – 1999. – Т. 9, № 2. – С. 47.
4. Игнатенко М. Е., Немцева Н. В. Механизмы взаимодействия автотрофного и гетеротрофного компонентов в альгобактериальных сообществах // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. – 2012. – № 3. – URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/7IgnatenkoME.pdf>. – Дата публ.: не указ.
5. Комиссарова А. В., Икромова С. Б. Микроводоросль спирулина: культивирование и особенности её биохимического состава // Аллея Науки. – 2020. – № 11, т. 1. – С. 186–190. – URL: [https://alley-science.ru/domains\\_data/files/Collection\\_of\\_journals/Noyabr\\_1\\_tom2020.pdf](https://alley-science.ru/domains_data/files/Collection_of_journals/Noyabr_1_tom2020.pdf). – Дата публ.: не указ.
6. Кублановская А. А. Микробные сообщества каротиногенной микроводоросли *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrons) Rostafinski (*Chlorophyta*) в природе и при культивировании : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.02.01. – Москва, 2019. – 24 с.
7. Куприянова Е. В., Самылина О. С. CO<sub>2</sub>-концентрирующий механизм и его особенности у галоалкалофильных цианобактерий // Микробиология. – 2015. – Т. 84, № 2. – С. 144–159. – <https://doi.org/10.7868/S0026365615010073>
8. Лелеков А. С. Количественные закономерности роста микроводорослей в культуре и параметры управления процессом фотобиосинтеза : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 1.5.2. – Севастополь, 2023. – 45 с.
9. Практикум по микробиологии / под ред. А. И. Нетрусова. – Москва : Academia, 2005. – 603 с.
10. Родина А. Г. Методы водной микробиологии : практ. рук. – Москва : Наука, 1965. – 364 с.
11. Тархова Э. П. Микроорганизмы, сопутствующие *Spirulina platensis* в накопительной культуре // Экология моря / НАН Украины, Ин-т биологии юж. морей им. А. О. Ковалевского. – Севастополь, 2005. – Вып. 70. – С. 49–52.
12. Тиберкевич Н. Я., Сакевич А. И. Коррелятивные связи между фотосинтезом и количеством бактерий-спутников в культурах водорослей // Альгология. – 1999. – Т. 9, № 2. – С. 141.
13. Троицкий А. С., Сорокин Ю. И. К методике расчёта биомассы бактерий в водоёмах // Труды Института биологии внутренних вод АН СССР. – Борок, 1967. – Вып. 15. – С. 85–90.
14. Хаддад Р. И., Багдасарян С. Н., Давидян Т. С., Африкян Э. К. Микроводоросль спирулина и ее микрофлора // Биологический журнал Армении. – 1990. – Т. 43, № 3. – С. 235–239.
15. Чекушкин А. А., Авсиян А. Л., Лелеков А. С. Продуктивность культуры *Arthrospira platensis* Gomont 1892 в условиях естественного освещения // Труды Карадагской научной станции им. Т. И. Вяземского – природного заповедника РАН. – 2022. – № 4. – С. 33–44. – <https://doi.org/10.21072/eco.2022.24.02>

16. *AlSulaiman M. A.* Microbiological quality of locally produced *Spirulina* in comparison with a commercial sample // *Biosciences. Biotechnology Research. Asia.* – 2011. – Vol. 8, nr 1. – P. 137–141. – <https://doi.org/10.13005/bbra/835>
17. *Azarpour A., Zendejboudi S., Mohammadzadeh O., Rajabzadeh A., Chatzis I.* A review on microalgal biomass and biodiesel production through co-cultivation strategy // *Energy Conversion and Management.* – 2022. – Vol. 267. – Art. 115757. – <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.115757>
18. *Borowitzka M. A.* High-value products from microalgae – their development and commercialization // *Journal of Applied Phycology.* – 2013. – Vol. 25, iss. 3. – P. 743–756. – <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>
19. *Bratbak G.* Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy // *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology* / ed. by P. F. Kemp [et al.]. – Boca Raton : Lewis Publ., 1993. – P. 309–316. – <https://doi.org/10.1201/9780203752746>
20. *Chroeder D. C., Oke J., Hall M., Malin G., Wilson W. H.* Virus succession observed during an *Emiliana huxleyi* bloom // *Applied and Environmental Microbiology.* – 2003. – Vol. 69, iss. 5. – P. 2484–2490. – <https://doi.org/10.1128/AEM.69.5.2484-2490.2003>
21. *Falquet J., Hurni J.-P.* Spiruline. Aspects Nutritionnels. – [S. l.] : Antenna Technologies, 2006. – 41 p.
22. *Flynn K. J., Kenny P., Mitra A.* Minimising losses to predation during microalgae cultivation // *Journal of Applied Phycology.* – 2017. – Vol. 29, iss. 4. – P. 1829–1840. – <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10811-017-1112-8>
23. *Gorobets O. B., Blinkova L. P., Baturo A. P.* Effect of microalgae on viability of microorganisms in the natural and artificial environment // *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* – 2001. – Iss. 1. – P. 104–108.
24. *Kallmeyer J., Smith D. C., Spivac A. J., D'Hondt S.* New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments // *Limnology and Oceanography: Methods.* – 2008. – Vol. 6, iss. 6. – P. 236–245. – <https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.236>
25. *Lafarga T., Fernández-Sevilla J. M., González-López C., Ación-Fernández F. G.* *Spirulina* for the food and functional food industries // *Food Research International.* – 2020. – Vol. 137. – Art. 109356. – <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356>
26. *Lee S. S., Furman J. A.* Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1987. – Vol. 53, nr 6. – P. 1298–1303. – <https://doi.org/10.1128/aem.53.6.1298-1303.1987>
27. *Lunau M., Lemke A., Walther K., Martens-Habbena W., Simon M.* An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy // *Environmental Microbiology.* – 2005. – Vol. 7, iss. 7. – P. 961–968. – <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00767.x>
28. *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 // *Applied and Environmental Microbiology.* – 1997. – Vol. 63, nr 1. – P. 186–193. – <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.186-193.1997>

29. Muys M., Sui Y., Schwaiger B., Lesueur C., Vandenheuvel D., Vermeir P., Vlaeminck S. E. High variability in nutritional value and safety of commercially available *Chlorella* and *Spirulina* biomass indicates the need for smart production strategies // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 275. – P. 247–257. – <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.059>
30. Noble R. T., Fuhrman J. A. Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria // *Aquatic Microbial Ecology*. – 1998. – Vol. 14, iss. 2. – P. 113–118. – <https://doi.org/10.3354/ame014113>
31. Qin L., Yin Z., Li Y., Tian L., Zhu L. Exploring the way forward: current status and new upgrading trends of the research on microalgae-based wastewater treatment // *Journal of Water Process Engineering*. – 2024. – Vol. 64. – Art. 105581. – <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105581>
32. Shiraishi H. Association of heterotrophic bacteria with aggregated *Arthrospira platensis* exopolysaccharides: implications in the induction of axenic cultures // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. – 2015. – Vol. 79, iss. 2. – P. 331–341. – <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.972333>
33. Smith V. H., Foster B. L., Grover J. P., Holt R. D., Leibold M. A., deNoyelles F. Phytoplankton species richness scales consistently from laboratory microcosms to the world's oceans // *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. – 2005. – Vol. 102, iss. 12. – P. 4393–4396. – <https://doi.org/10.1073/pnas.0500094102>
34. Strittmatter M., Guerra T., Silva J., Gachon C. M. M. A new flagellated dispersion stage in *Paraphysoderma sedebokerense*, a pathogen of *Haematococcus pluvialis* // *Journal of Applied Phycology*. – 2016. – Vol. 28, iss. 3. – P. 1553–1558. – <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0700-8>
35. Wu J. F., Pond W. G. Amino acid composition and microbial contamination of *Spirulina maxima*, a blue-green alga, grown on the effluent of different fermented animal wastes // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1981. – Vol. 27, iss. 1. – P. 151–159. – <https://doi.org/10.1007/BF01611001>
36. Zarrouk C. Contribution a l'étude d'une cyanobacterie: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* : PhD thesis. – Paris, 1966. – 138 p.
37. Zobell C. E. The effect of solid surfaces upon bacterial activity // *Journal of Bacteriology*. – 1943. – Vol. 46, no. 1. – P. 39–56. – <https://doi.org/10.1128/jb.46.1.39-56.1943>

**ASSOCIATED MICROBIOTA OF *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS* CULTURE  
UNDER CHANGING LIMITING FACTORS CONDITIONS**

**Rylkova O. A., Doroshenko Yu. V., Lelekov A. S., Harchuk I. A.**

*A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,  
e-mail: a.lelekov@ibss.su*

**Abstract:** In natural and laboratory conditions, cyanobacteria and microalgae coexist with microbial communities that can have a stimulating or inhibitory effect on the physiology, growth and development of algae cultures. To assess contamination and determine the proportion of associated microbiota in *A. platensis* culture, the quantitative composition, diversity of physiological groups and morphological structure of the bacterial association were studied at different growth phases of accumulation and flow-through cyanobacteria culture. Standard methods of *A. platensis* biomass accumulation studies, microbiological, microscopic and cytometric approaches were used in the study of associated microbiota. It was shown that the number of heterotrophs according to the data

of flow cytometry, after staining with SYBR Green fluorochrome ( $0.3 \cdot 10^8$ – $1.6 \cdot 10^8$  cell ml<sup>-1</sup>) exceeded the data obtained by sowing on solid media ( $5 \cdot 10^6$ – $1.3 \cdot 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>). The dynamics of changes in quantitative indices obtained by these methods was similar: minimum values were obtained at the exponential, maximum values at the first exponential phase of growth. Flow cytometry greatly simplified the bacterial association counting, but preliminary physicochemical sample preparation is necessary when working with *A. platensis* culture. With minimal amounts of companion bacteria, both the diversity of physiological groups and morphotypes of associated microorganisms were observed. In stationary stage I alkaliphilic microorganisms (98.8 %) represented by bacilli-form bacteria of various lengths (87 %) dominated at high abundance at maximum pH (11.8). The development of other physiological groups was probably inhibited by the high alkalinity of the medium. At stationary stage II the some decrease in pH and microbiota abundance, alkaliphilic microbiota continued to dominate (82 %), but the contribution of yeasts and fungi increased (up to 16 %). Thus, the pH of the culture medium during spirulina cultivation largely determines both the abundance and diversity of the bacterial community. Despite the small contribution, the associated microflora can influence the quality of the obtained biomass of lower phototrophs during their industrial cultivation. The conducted studies allow us to give recommendations on the modes of cultivation and collection of *A. platensis* biomass.

**Keywords:** batch culture, productivity, bacteria, abundance, physiological groups, morphological structure

### Сведения об авторах

Рылькова  
Ольга  
Александровна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, [ol.rylkova@ibss-ras.ru](mailto:ol.rylkova@ibss-ras.ru)

Дорошенко  
Юлия  
Валерьевна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, [doroshenko\\_yuv@ibss-ras.ru](mailto:doroshenko_yuv@ibss-ras.ru)

Леменов  
Александр  
Сергеевич доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, [a.lelekov@ibss.ru](mailto:a.lelekov@ibss.ru)

Харчук  
Ирина  
Алексеевна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, [kharchuk@ibss.ru](mailto:kharchuk@ibss.ru)

*Поступила в редакцию 30.10.2024 г.*

*Принята к публикации 27.11.2024 г.*