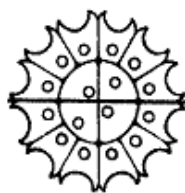


Том 31
2•2021



АЛГО
ЛОГІЯ

МІЖНАРОДНИЙ
НАУКОВО-ТЕХНІЧНИЙ
ЖУРНАЛ

ALGOLOGIA

ЗАСНОВАНИЙ У БЕРЕЗНІ 1991 р. • ВИХОДИТЬ 1 РАЗ НА ТРИ МІСЯЦІ • КИЇВ

ЗМІСТ

Генетика

- 113 Боднар О.І., Андрєєв І.О., Прокоп'як М.З., Дробик Н.М., Грубінко В.В. Аналіз генетичного поліморфізму культури *Chlorella vulgaris* Beyer. за вирощування в присутності селеніту натрію в комбінації з сульфатом цинку чи хлоридом хрому

Фізіологія, біохімія, біофізика

- 126 Ле Дін Хунг, Во Ті Дьє Транг. Лектин, специфічний до N-ацетилнейрамінової кислоти, з червоної водорості *Gracilaria canaliculata* Sonder та його антибактеріальна активність

Викопні водорості

- 141 Пушкар В.С. Комплекси діатомей верхнього пліоцену та їхнє значення для встановлення нижньої межі квартеру (південь Далекого Сходу)

Систематика, філогенія, питання еволюції водоростей

- 150 Садогурська С.С. Неприкріплена форма цистозіри в Чорному морі: таксономія *Gongolaria barbata* f. *repens* comb. nov.

Нові та рідкісні таксони

- 163 Генкал С.І. Новий для флори України вид роду *Aulacoseira* Thw. (*Bacillariophyta*)

Прикладна альгологія

- 170** Шаран Л.В., Венніла Дж.Дж. Фітофармакологічне дослідження водорості *Karraphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (*Rhodophyta*) для застосування при оральних захворюваннях

Персоналії

- 200** Ольштинська О.П. Пам'яті колеги. Стрельнікова Ніна Іванівна (28.05.1933 – 07.12.2020)

Нові книги

- 204** А.А.-А. Еннан та ін. Енциклопедія Куяльницького лиману

Наукові редактори випуску:

ЗОЛОТАРЬОВА О.К., ОЛЬШТИНСЬКА О.П., МІНІЧЕВА Г.Г.,
ЦАРЕНКО П.М., ШАЛИГІН С.С.

Редактори

В.В. Несчетна, О.Є. Бондаренко

Адреса редакції: 01601 Київ, вул. Терещенківська, 2,
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ, тел. 235-13-11

Address of the Editorial Office: M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,
2 Tereshchenkivska Str., 01601 Kyiv, tel. 235-13-11

e-mail: algologia@ukr.net

caim: www.algologia.co.ua

Оригінал-макет виготовлено в редакції журналу «Альгологія»

Номер реєстраційного свідоцтва КВ-№ 21246-11046ПР від 27.02.2015

Затверджено до друку вченою радою Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАНУ
(протокол № 5 від 18 травня 2021 р.)

Підп. до друку 25.05.2021. Формат 70×108/16. Ум.-друк. арк. 9,8. Обл.-вид. арк. 13,72.
Тираж 93 прим. Зам. №

Віддруковано ВД «Академперіодика» НАН України, вул. Терещенківська, 4, Київ 01601
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 544 від 27.07.2001

Аналіз генетичного поліморфізму культури *Chlorella vulgaris* Beyer. за вирощування в присутності селеніту натрію в комбінації з сульфатом цинку та хлоридом хрому

Боднар О.І.¹, Андрєєв І.О.², Прокоп'як М.З.¹, Дробик Н.М.¹, Грубінко В.В.¹

¹Тернопільський національний педагогічний університет імені В. Гнатюка,
вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль 46027, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03143, Україна
bodnar@chem-bio.com.ua

Надійшла до редакції 05.04.2021. Після доопрацювання 15.05. 2021. Підписана до друку 16.05.2021.
Опублікована 29.06.2021

Реферат. Досліджено генетичний поліморфізм *Chlorella vulgaris* за дії мікроелементів селену, цинку і хрому для оптимізації способу культивування водоростей та отримання корисних сполук. Метали та неметали, потрапляючи у клітину, проявляють високу біохімічну дію, модифікуючи метаболічні реакції, у т. ч. пов'язані з функціонуванням генетичного апарату клітин мікрowodоростей. У роботі використані загальноприйняті гідробіологічні методи вирощування водоростей, метод виділення ДНК за Rogers, Bendich (1985); молекулярно-генетичний аналіз з використанням ISSR (inter simple sequence repeats) та IRAP (inter-retransposon amplified polymorphism) маркерів. Для всіх зразків *C. vulgaris* отримано 109 фрагментів, 42 з яких виявилися поліморфними (38,5%). Генетичні відстані за Жаккардом (D_j) між зразками культури *C. vulgaris*, отриманої за вирощування на середовищах різного складу та контролем (водорості, вирощені за стандартних умов), становили: 0,232 за дії селеніту окремо, 0,206 за спільної дії селеніту і цинку та 0,300 за спільної дії селеніту і хрому. Встановлено, що додаткове внесення мікроелементів у середовище культивування обумовлює певні модифікації генетичного апарату клітин водорості. Водночас виявлені зміни у водоростей, вирощених на середовищах із вмістом різних мікроелементів та їхніх поєднань, знаходяться в межах рівня генетичного поліморфізму одноклітинних зелених водоростей за природних умов росту, що свідчить про відсутність суттєвого генотоксичного впливу мікроелементів і високу метаболічну та генетичну пластичність культури водоростей.

Ключові слова: *Chlorella vulgaris*, мікроелементи, ISSR- та IRAP-маркери, генетичний поліморфізм, генетичні відстані за Жаккардом

© Боднар О.І., Андрєєв І.О., Прокоп'як М.З., Дробик Н.М., Грубінко В.В., 2021

Вступ

Сьогодні інтерес до потенційних комерційних сполук із мікр водоростей обумовлений необхідністю з'ясування механізмів підвищення їхньої стресостійкості, збільшення продуктивності, інтенсифікації обміну речовин і спрямування метаболізму для активації тих чи інших біосинтетичних процесів та отримання корисних речовин (Richmond, Hu, 2013). Поряд із біохімічними методами регуляції активно застосовуються генетичні методи трансформації метаболізму, які полягають у вивченні геному водоростей, експресії відповідних генів та утворенні нових генетично модифікованих штамів (Alzahrani, 2013; Shrestha et al., 2013).

Відомо, що водорості містять значну кількість груп активних органічних компонентів різної хімічної будови із різними властивостями. Серед них полісахариди (альгінати, ламінарин, агар), пігменти (хлорофіли, каротиноїди, лютеїн), ліпіди (насичені та поліненасичені жирні кислоти), пептиди і протеїни, а також вітаміни та мінерали. Для багатьох цих сполук характерний широкий спектр потенційного лікувально-профілактичного впливу (антиоксидантний, протираковий, антивірусний, антибактеріальний, антиалергічний, антидіабетичний, протизапальний, тощо) на організм тварин і людини (Liu, Hu, 2013; Richmond, Hu, 2013). Тому актуальним і перспективним способом лікування та профілактики багатьох захворювань може виявитися використання натуральних біологічно активних добавок з водоростей (Skrivan et al., 2010; Liu, Hu, 2013). Завдяки своїм високим адсорбційним властивостям водорості здатні поглинати та акумулювати метали й неметали проти градієнту концентрації та включати їх до складу внутрішньоклітинних органічних молекул (Richmond, Hu, 2013). З огляду на це, інтерес становлять водоростеві комплекси селену (компонент антиоксидантної системи) і біологічно активних металів – цинку (один з найважливіших регулюючих мікроелементів у живих організмах) та хрому (фактор толерантності до глюкози) (Skrivan et al., 2010; Yoshida et al., 2011; Vincent, 2013).

Хлорела, завдяки швидкому росту і розмноженню та невибагливості до умов вирощування, є класичним об'єктом для різноманітних лабораторних досліджень і сировиною для отримання корисних продуктів в аквакультурі (Afkar et al., 2010; Liu, Hu, 2013; Richmond, Hu, 2013). На відміну від морфологічних, біохімічних та фізіологічних ознак, які значною мірою залежать від віку культури і фізико-хімічних умов культивування та не завжди мають чітку видову специфічність, генетичні ознаки зазвичай більш стабільні.

Сьогодні молекулярно-генетичні методи широко використовуються для ідентифікації організмів та встановлення генетичних зв'язків між ними, зокрема й одноклітинних водоростей (Roshani et al., 2012; Wongsawad et al., 2015).

Раніше нами було встановлено, що використання натрій селеніту окремо та у комбінації з сульфатом цинку чи хлоридом хрому для біотехнологічного культивування *C. vulgaris* з метою отримання корисних сполук, збагачених мікроелементами, є оптимальним з огляду на моделювання метаболічного статусу водоростей та активації ліпідного метаболізму (Lukashiv et al., 2017; Bodnar et al., 2018). Водночас невідомо, як культивування за таких умов впливає на генетичні показники культури водоростей.

У роботі А.М. Alzahrani (2013) показано, що поряд із фізіологічними та біохімічними змінами за адаптації культури *C. vulgaris* до підвищених концентрацій купруму відбуваються зміни генетичних характеристик культури. Відмінності, визначені за допомогою ISSR-ПЛР (метод молекулярно-генетичного аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції ПЛР), між культурою диких водоростей та дібраною за стійкістю до купруму культурою перевищували 60%.

Тому комплексний підхід до вивчення впливу металів і неметалів як ефективних регуляторів метаболізму у водоростей, що полягає у використанні традиційних фізіолого-біохімічних та молекулярно-генетичних методів дослідження, дасть змогу визначити рівень генетичних змін культури за дії використаних мікроелементів, а також встановити їхні оптимальні концентрації. Це дозволить більш ефективно проводити добір стійких до потенційно токсичних хімічних елементів штамів водоростей (Alzahrani, 2013; Kebeish et al., 2014).

Одними з найефективніших інструментів дослідження генетичного поліморфізму, завдяки своїй простоті, високій чутливості та швидкості проведення, є методи молекулярно-генетичного аналізу на основі ПЛР (Malyshev, Kartel, 1997; Mostafa et al., 2011), зокрема з використанням мультилокусних ISSR-маркерів (inter simple sequence repeats) (Mostafa et al., 2011; Alzahrani, 2013) та IRAP-маркерів (inter-retransposon amplified polymorphism) (Malyshev, Kartel, 1997).

Матеріали та методи

Об'єктом лабораторного дослідження була альгологічно чиста культура зеленої водорості *Chlorella vulgaris* HPDP-119 із колекції Інституту гідробіології НАН України, яку вирощували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема № 11 при температурі 22–25 °С та освітленні лампами денного світла інтенсивністю 2500 лк протягом 16 год (Torachevskiy, 1975).

У культуральне середовище додавали водні розчини Na_2SeO_3 у розрахунку на кількість іонів Se(IV) – 10,0 мг/дм³ окремо та спільно з $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ у розрахунку Zn^{2+} – 5,0 мг/дм³ або з $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ у розрахунку на вміст Cr^{3+} – 5,0 мг/дм³. Контролем слугувала культура, вирощена у

стандартному середовищі без додавання селеніту натрію та солей хрому і цинку. Клітини для виділення ДНК відбирали на 7-у добу культивування.

ДНК виділяли за стандартним протоколом із біомаси водоростей, висушеної при температурі 37 °C (Rogers, Bendich, 1985). У результаті попереднього скринінгу з 8 ISSR- та 4 IRAP-праймерів для роботи було відібрано 7 і 1 відповідно, які забезпечували синтез чітких відтворюваних ампліконів (послідовності праймерів наведено у табл. 1).

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності ISSR- та IRAP-праймерів

п/п	Тип праймера	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність, (5' – 3')
1	ISSR	UBC#03	5' ACA CAC ACA CAC ACA CTT 3'
2		UBC#04	5' ACA CAC ACA CAC ACA CAG 3'
3		UBC#05	5' ACA CAC ACA CAC ACA CTG 3'
4		UBC#23	5' ACA CAC ACA CAC ACA CTA 3'
5		UBC#807	5' AGA GAG AGA GAG AGA GT 3'
6		UBC#836	5' AGA GAG AGA GAG AGA GYA 3'
7		UBC#840	5' GAG AGA GAG AGA GAG AYT 3'
8		UBC#811	5' GAG AGA GAG AGA GAG AC 3'
9	IRAP	642	5' TTTGAAAACCTGGCGGCAACG 3'
10		866	5' ACCAGCCCGGGCCGTCGACC 3'
11		1651	5' TGACCAAGGGCGCGTATCGTG 3'
12		1681	5' ATACCTCGGAGGCGCTGCACCTG 3'

Примітка. Напівжирним шрифтом виділені праймери, які забезпечували синтез чітких відтворюваних послідовностей і були використані для генетичного аналізу; Y = C/T.

Ампліфікацію проводили у термоциклері Терцик MC2 (Биотехнология, Росія). Реакційна суміш містила: 20 нг ДНК (IRAP-аналіз), 30 нг ДНК (ISSR-аналіз), 0,2 мМ dNTP (Fermentas, Литва), 1,25 U Taq-полімерази (Амплісенс, Росія), 0,5 мМ праймера, 1 × ПЛР-буфер на (NH₄)₂SO₄ з 2,5 мМ MgCl₂ (Fermentas, Литва). Зверху нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. Для проведення ПЛР встановлювали наступні режими: ISSR-ПЛР: 94 °C – 2 хв, 35 циклів (94 °C – 30 с, 53 °C – 30 с, 72 °C – 1,5 хв), 72 °C – 2,5 хв; IRAP-ПЛР: 94 °C – 2 хв, 35 циклів (94 °C – 30 с; 58 °C – 30 с; 72 °C – 1,5 хв), 72 °C – 2,5 хв. Продукти ампліфікації розділяли електрофорезом в 1,3%-му агарозному гелі з додаванням

0,5 мкг/мл бромистого етидію в $1 \times$ SB-буфері (5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 8,5) впродовж 5–6 год за напруженості електричного поля 4–5 В/см. Для визначення довжини фрагментів використовували маркер молекулярної маси (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb DNA Ladder), який містив фрагменти ДНК наступних розмірів: 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1500; 3000 п. н. (ООО-СибЭнзим-М, Москва).

Обробку електрофореграм проводили за допомогою програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics). Для статистичної оцінки даних ПЛР-аналізу застосовували програми FAMD 1.25 (Schluter, Harris, 2006) і GenAlEx 6.5 (Peakall, Smouse, 2006). Для оцінки рівня генетичних відмінностей використовували такі параметри, як частку поліморфних ампліконів та генетичні відстані за Жаккардом (D_j). Отримані експериментальні дані опрацьовували за допомогою програми Statistica 6.0.

При проведенні експериментальних досліджень застосовували реактиви фірм «Sigma», «Lachema», «Reanal», «Химреактив» (кваліфікація «ч.д.а.»), «Амплісенс», «Fermentas» та «ООО-СибЭнзим-М».

Результати та обговорення

Використані ISSR- та IRAP-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах: 180–2600 і 190–3400 п. н. відповідно. На рисунку представлені електрофореграми, які демонструють поліморфізм профілів ПЛР-продуктів зразків культури *C. vulgaris*, отриманої при вирощуванні на середовищах різного складу.

При визначенні генетичного поліморфізму у *C. vulgaris* за допомогою ISSR-праймерів отримані нами ПЛР-продукти були схожими за розмірами, як у випадку з *C. vulgaris* та *C. pyrenoidosa*, за використання цього ж виду праймерів, та знаходилися в межах 200–2600 п. н. (Shen, 2008).

Загальна кількість фрагментів для всіх зразків, що синтезувалися за використання 1 IRAP- та 7 ISSR-маркерів (табл. 2), становила 109, з яких 42 виявилися поліморфними (38,5%), причому праймер UBC#840 (ISSR) показав найвищий рівень поліморфізму (81%), а UBC#04 (ISSR) – найменший (7,7%). У роботі S. Shen (2008) показано, що частка поліморфних ампліконів у чотирьох клонів *C. vulgaris* за стандартних умов культивування становила 39,6%, що відповідає отриманим нами даним за впливу селену окремо та спільно з цинком чи хромом.

Нами було визначено показник генетичних дистанцій за Жаккардом (D_j) між зразками культури *C. vulgaris*, отриманої при вирощуванні на середовищах різного складу (з додаванням селену, цинку і хрому), та контролем. Розраховані на основі даних ПЛР-аналізу генетичні дистанції за Жаккардом показали, що найбільші відмінності від контролю (0,300) мав зразок культури *C. vulgaris*, вирощений на середовищі з вмістом селеніту натрію та хлориду хрому, а найменші (0,206) – зразок культури *C. vulgaris*, вирощеної за присутності селеніту натрію та сульфату цинку (табл. 3).

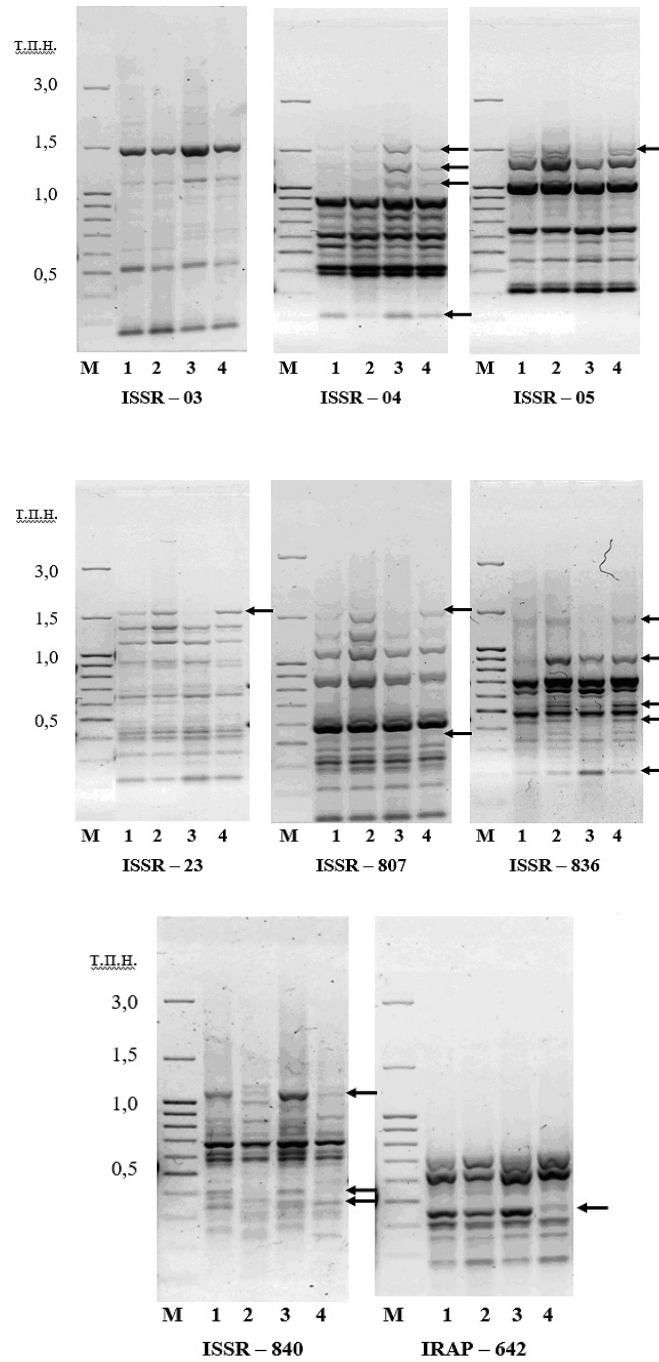


Рисунок. Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів зразків культури *Chlorella vulgaris*, отриманої при вирощуванні на середовищах різного складу: 1 – контроль, 2 – водорості, вирощені з додаванням Se(IV) 10,0 мг/дм³, 3 – Se(IV) 10,0 та Zn(II) 5,0 мг/дм³, 4 – Se(IV) 10,0 та Cr(III) 5,0 мг/дм³. М – маркер молекулярної маси ДНК

Таблиця 2. Характеристика ПЛР-продуктів *Chlorella vulgaris* відповідно з отриманими нами даними ISSR- та IRAP-маркерів

Праймер	Кількість ампліконів	Кількість поліморфних ампліконів
ISSR-03	15	7
ISSR-04	13	1
ISSR-05	10	1
ISSR-23	17	7
ISSR-807	13	1
ISSR-836	11	7
ISSR-840	21	17
IRAP-642	8	1
Загалом	109	42

Таблиця 3. Генетичні дистанції за Жаккардом, розраховані на основі даних ISSR- та IRAP-ПЛР

Умови	1	2	3	4
Контроль	–			
Se(IV)	0,232	–		
Se(IV) + Zn(II)	0,206	0,216	–	
Se(IV) + Cr(III)	0,300	0,148	0,298	–

1 – контроль; 2 – водорості, вирощені з Se(IV) 10,0 мг/дм³; 3 – з Se(IV) 10,0 та Zn(II) 5,0; 4 – із Se(IV) 10,0 та Cr(III) 5,0 мг/дм³.

При культивуванні *C. vulgaris* на середовищі з селенітом натрію D₃ становила 0,232 по відношенню до контролю. При додаванні окрім селеніту натрію ще й сульфату цинку цей показник знижувався на 12% (табл. 3). Отже, можна припустити, що цинк модулює та контролює накопичення генетичних змін у культурі *C. vulgaris*, оскільки їхня кількість нижча, ніж у зразка, культивованого лише з селенітом натрію.

Таким чином, встановлено, що культивування *C. vulgaris* у присутності селену, цинку або хрому супроводжується змінами генетичних характеристик культури водоростей. Ці зміни можна пояснити мутагенним впливом згаданих елементів у використаних концентраціях. Однак, враховуючи коротку тривалість періоду культивування, впродовж якого

могло відбутися лише близько трьох клітинних поділів, та існуючі літературні дані, це припущення здається мало ймовірним.

У роботі (Sun et al., 2014) показано, що нижчі із досліджуваних концентрації Se (≤ 75 мг/дм³) позитивно впливають на ріст культури *C. vulgaris* та проявляють яскраву антиоксидантну дію, інгібуючи перекисне окислення ліпідів та утворення активних форм кисню при вирощуванні впродовж 144 год (6 діб). За цих умов також спостерігали суттєве пришвидшення росту клітин і збільшення вмісту органічного Se у водоростях. Пригнічення росту водорості спостерігали лише при підвищенні концентрації Se у середовищі понад 100 мг/дм³ (Sun et al., 2014).

Біологічна активність сполук селену у клітинах прямо чи опосередковано пов'язана з протеїнами: селенцистеїном, селенметіоніном, глутатіонпероксидазою, тіоредоксинредуктазою, тощо (Yoshida et al., 2011). Належна кількість селену у складі цих сполук забезпечує нормальний перебіг процесів захисту ДНК та хромосом від пошкоджень, розривів, делецій та утворення аддуктів. Сполуки селену можуть також здійснювати модуляції метилювання ДНК або гальмування деацетилювання гістонових протеїнів (Ferguson et al., 2012). Відмічено також додаткову протекторну функцію селену щодо генетичного апарату клітин через селенметіонін-індуковану реакцію репарації ДНК і зростання активності репаративних ензимів – ДНК-глікозилаз (передусім p53, BRCA1 та Gadd45), які відновлюють пошкоджені ділянки ДНК (Fischer et al., 2006; Bera et al., 2013).

Водночас оптимальні кількості цього мікроелементу для життєдіяльності кожного організму залежать найперше від його генотипу та біологічних особливостей (Ferguson et al., 2012). Детальніші дослідження механізмів впливу селену на процеси відновлення ДНК допоможуть пояснити наявні у літературі суперечливі дані стосовно мінімальних його кількостей для максимального захисту і стабільності геному у всіх організмів (Bera et al., 2013).

У роботі S. Maeda et al. (1990) показано, що концентрація цинку в середовищі до 20 мг/дм³ практично не впливала на функціонування культури *C. vulgaris*, тоді як концентрація 10 мг/дм³ обумовила кращий і швидший ріст у порівнянні з контролем. В іншому дослідженні процеси росту культури *C. pyrenoidosa* за концентрацій Zn^{2+} 5–10 мг/дм³ не змінювалися у порівнянні з контрольною культурою (Zhou et al., 2012).

Цинк необхідний для функціонування багатьох протеїнів, що містять так звані «цинкові пальці»: ділянки протеїну, які стабілізовані одним або двома іонами цинку і мають характерну просторову структуру. Такі ділянки входять до складу протеїнових доменів, відповідальних за зв'язування ДНК, РНК, інших протеїнів та невеликих молекул.

Цинковмісні протеїни дуже поширені у клітинах еукаріот і виконують різноманітні функції: розпізнавання ДНК, пакування РНК, активація транскрипції, регуляція апоптозу, формування просторової структури протеїну та зв'язування ліпідів (Laity et al., 2001). При дослідженні транскрипційних факторів у мікроводоростей представників *Haptophyta*, *Bacillariophyta*, *Heterokontophyta*, *Chlorophyta* та *Rhodophyta* (Thiriet-Rupert et al., 2016), встановлено, що в середньому до 10% з них належить до класу протеїнів з «цинковими пальцями». Також показана активна участь цієї групи протеїнів у реакціях-відповідях клітин на біотичні та абіотичні стресові чинники (Deng et al., 2012; Peng et al., 2012).

Питання біологічної активності хрому досі залишається суперечливим і передусім залежить від видової приналежності та генотипу організму. З'ясовано, що для багатьох видів нижчих рослин, включаючи водорості, хром є токсичним (Cervantes et al., 2001; Fang et al., 2014). У підвищених концентраціях цей метал проявляє канцерогенну дію з суттєвим порушенням метаболізму та складним механізмом мутагенезу. Доведено, що Cr(III) є менш небезпечним, ніж Cr(VI) (Fang et al., 2014).

Таким чином, концентрації селену і цинку, використані в нашій роботі, істотно не впливають на приріст біомаси водорості, а отже, не проявляють значний генотоксичний вплив. Лише хром за таких концентрацій здатний частково пригнічувати ріст *C. vulgaris* (Meisch, Schmitt-Beckmann, 1979; Qian et al., 2013), потенційно міг би мати мутагенний вплив, але за умови більш тривалого культивування.

Отже, повинні бути інші причини виявлених нами змін у генетичних характеристиках культури *C. vulgaris*. Найбільш імовірною причиною може бути початкова генетична гетерогенність використаної культури. S. Shen (2008) за допомогою ISSR-ПЛП порівняв окремі клони двох видів водоростей і показав, що за природних умов їх росту генетичні відстані за Жаккардом між чотирма клонами *C. vulgaris* варіюють в межах 0,218–0,321, а між трьома штамми *C. pyrenoidosa* – від 0,190 до 0,275 (Shen, 2008).

Отже, можна припустити, що виявлені нами генетичні зміни є наслідком селективного добору певної частини генетично-гетерогенної популяції клітин *C. vulgaris*, найбільш пристосованої до змінених умов культивування (Hovde et al., 2018). Наслідком цього стали зміни генетичної структури клітинної популяції, які й відобразилися у появі виявлених нами генетичних відмінностей між варіантами культури, отриманими на різних середовищах. Однак для перевірки цього припущення, як і для визначення генотоксичного впливу використаних у роботі елементів, необхідно провести додаткові експерименти на культурах водоростей, отриманих шляхом попереднього клонування.

Висновки

За культивування *Chlorella vulgaris* у присутності селеніту натрій окремо та спільно із сульфатом цинку та хлоридом хрому відбуваються зміни генетичних характеристик культури, згідно до результатів ISSR- та IRAP-ПІР. Генетичні відстані (D_j) між отриманими варіантами культури (мікропопуляціями) хлорели варіюють у межах 0,206–0,300. Додаткове внесення солей селену, цинку і хрому у середовище культивування *C. vulgaris* у досліджуваних концентраціях засвідчило відсутність їхньої суттєвої генотоксичності на водорості. Тому припускаємо, що зазначені сполуки можна використовувати в біотехнологічному процесі для отримання альгобіомаси, збагаченої мікроелементами.

IRAP-праймери (розроблені для різних видів рослин) для роботи люб'язно надав д-р Р.М. Календар (MTT/BI Plant Genomics, Institute of Biotechnology, University of Helsinki).

Список літератури

- Afkar E., Ababna H., Fathi A.A. 2010. Toxicological response of the green alga *Chlorella vulgaris* to some heavy metals. *Am. J. Environ. Sci.* 6(3): 230–237.
- Alzahran A.M. 2013. ISSR-PCR-based genetic diversity analysis on copper-tolerant versus wild type strains of the unicellular alga *Chlorella vulgaris*. *Sci. J. King Faisal Univ. Basic and Appl. Sci.* 14(2): 63–78.
- Bera S., De Rosa V., Rachidi W., Diamond A. 2013. Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention? *Mutagenesis.* 28(2): 127–134.
- Bodnar O.I., Kovalska H.B., Grubinko V.V. 2018. Regulation of biosynthesis of lipids in *Chlorella vulgaris* by compounds of Zinc, Chromium and Selenium. *Regul. Mech. Biosyst.* 9(2): 267–274.
- Cervantes C., Campos-Garc J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(3): 335–347.
- Deng H., Liu H., Li X., Xiao J., Wang S.A. 2012. CCCH-type zinc finger nucleic acid binding protein quantitatively confers resistance against rice bacterial blight disease. *Plant Physiol.* 158(2): 876–889.
- Fang Z., Zhao M., Zhen H., Chen L., Shi P., Huang Z. 2014. Genotoxicity of tri- and hexavalent chromium compounds in vivo and their modes of action on DNA damage in vitro. *PLOS ONE.* 9(8): 103–194.
- Ferguson L.R., Karunasinghe N., Zhu S., Wang A.H. 2012. Selenium and its' role in the maintenance of genomic stability. *Mutat. Res.* 733(1–2): 100–110.
- Fischer J.L., Lancia J.K., Mathur A., Smith M.L. 2006. Selenium protection from DNA damage involves a Ref1/p53/Brcal protein complex. *Anticancer Res.* 26(2A): 899–904.

- Hovde B.T., Hanschen E.R., Tyler C.R., Lo C.C., Kunde Y., Davenport K., Daligault H., Msanne J., Canny S., Eyun S.I., Riethoven J.J. 2018. Genomic characterization reveals significant divergence within *Chlorella sorokiniana* (Chlorellales, Trebouxiophyceae). *Algal Res.* 35: 449–461.
- Kebeish R., El-Ayouty Y., Husain A. 2014. Effect of copper on growth, bioactive metabolites, antioxidant enzymes and photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. *World Res. J. Biol. & Biol. Sci.* 2(2): 34–43.
- Laity J.H., Lee B.M., Wright P.E. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11(1): 39–46.
- Liu J., Hu Q. 2013. In: *Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology*. Oxford: Wiley, Ltd. Pp. 339–349.
- Lukashiv O.Y., Bodnar O.I., Grubinko V.V. 2017. Accumulation of Chromium and Selenium inside cells and in lipids of *Chlorella vulgaris* Beijer. during the incubation from chromium by sodium chloride and selenium. *Int. J. Algae.* 19(4): 357–366. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v19.i4.60>
- Maeda S., Mizoguchi M., Ohki A., Takeshita T. 1990. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater alga, *Chlorella vulgaris*. Pt I. Toxicity and accumulation. *Chemosphere.* 21(8): 953–963.
- Malyshev S.V., Kartel N.A. 1997. *Mol. Biol.* 31(2): 197–208. [Малышев С.В., Картель Н.А. Молекулярные маркеры в генетическом картировании растений. *Мол. биол.* 31(2): 197–208].
- Meisch H.U., Schmitt-Beckmann I. 1979. Influence of tri- and hexavalent chromium on two *Chlorella* strains. *Z. Pflanzenphysiol.* 94(3): 231–239.
- Mostafa N., Omar H., Tan S.G., Napis S. 2011. Studies on the genetic variation of the green unicellular alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) obtained from different geographical locations using ISSR and RAPD molecular marker. *Molecules.* 16(3): 2598–2608.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Not.* 6(1): 288–295.
- Peng X., Zhao Y., Cao J., Zhang W., Jiang H., Li X. 2012. CCCH-type zinc finger family in maize: genome-wide identification, classification and expression profiling under abscisic acid and drought treatments. *PLOS ONE.* 7(7): e40120.
- Qian H., Sun Z., Sun L., Jiang Y., Wei Y., Xie J., Fu Z. 2013. Phosphorus availability changes chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere.* 93(6): 885–891.
- Richmond A., Hu Q. 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd. 736 p.
- Rogers S.O., Bendich A.J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69–76.
- Roshani O., Mohd Syahril M.Z., Mohd Hafiz R. 2012. Genetic Polymorphisms of unicellular green algae strains using random amplified polymorphic DNA. In: *Proceedings of the International Conference on Science, Technology and Social Sciences (ICSTSS)*. Kuantan (Singapore): Springer. Pp. 635–640.

- Schluter P.M., Harris S.A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Not.* 6(2): 569–572.
- Shen S. 2008. Genetic diversity analysis with ISSR PCR on green algae *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 26(4): 380–384.
- Shrestha R.P., Haerizadeh F., Hildebrand M. 2013. In: *Handbook of Microalgal Culture. Applied Phycology and Biotechnology*. Oxford: Wiley, Ltd. Pp. 146–167.
- Skrivan M., Skrivanova V., Dlouha G., Branyikova I., Zachleder V., Vitova M. 2010. The use of selenium-enriched alga *Scenedesmus quadricauda* in chicken diet. *Czech J. Anim. Sci.* 55(12): 565–571.
- Sun X., Zhong Y., Huang Z., Yang Y. 2014. Selenium accumulation in unicellular green algae *Chlorella vulgaris* and its effects on antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments. *PLOS ONE*. 9(11): e112270.
- Thiriet-Rupert S., Carrier G., Chenais B., Trottier C., Bougaran G., Cadoret J-P. 2016. Transcription factors in microalgae: genome-wide prediction and comparative analysis. *BMC Genom.* 17: 282–298.
- Topachevskiy A.V. 1975. *Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice*. Kyiv: Naukova Dumka. 248 p. [Топачевский А.В. 1975. *Методы физиолого-биологического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев: Наук. думка. 248 с.].
- Vincent J.B. 2013. Chromium: is it essential, pharmacologically relevant, or toxic? *Met. Ions Life Sci.* 13: 171–198.
- Wongsawad P., Peerapornpisal Y., Wongsawad C. 2015. Molecular characterization of *Spirogyra* from Northern Thailand using inter simple sequence repeat (ISSR). *J. Adv. Biol. Biotechnol.* 3(2): 144–153.
- Yoshida S., Haratake M., Fuchigami T., Nakayama M. 2011. Selenium in Seafood Materials. *J. Health Sci.* 57(3): 215–224.
- Zhou G.J., Peng F.Q., Zhang L.J., Ying G.G. 2012. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19(7): 2918–2929.

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Bodnar O.I.¹, Andreev I.O.², Prokopiak M.Z.¹, Drobyk N.M.¹, Grubinko V.V.¹ 2021. **The analysis of the genetic polymorphism of *Chlorella vulgaris* Beyer. culture growing in the presence of sodium selenite, zinc sulfate and chromium chloride.** *Algologia*. 31(2): 113–125

¹Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University,
2 M. Kryvonosa Str., Ternopil 46027, Ukraine

²The Institute of Molecular Biology and Genetics of NASU,
150 Zabolotnogo Str., Kyiv 03143, Ukraine

The use of microalgae for the economic needs and the commercial goals determines the areas of the scientific researches that will make it possible to increase their productivity. It is also important to direct the metabolism of the algae to the activating of certain synthetic processes in order to obtain the desired compounds. The metals and non-metals, entering into the cell, have a high biochemical activity. These elements modify the metabolic reactions in general and the metabolic reactions related to the functioning of the genome of microalgae cells. **Aim.** The aim was to study the genetic polymorphism of *Chlorella vulgaris* under the action of such trace elements as selenium, zinc and chromium in order to optimize the methods of algae cultivation and the obtaining of the beneficial compounds. **Methods.** The hydrobiological methods of algae cultivation, DNA isolation method by Rogers S. and Bendich A. (1985), PCR-analysis with ISSR (inter simple sequence repeats)- and IRAP-markers (inter-retransposon amplified polymorphism) have been used. **Results.** For all samples of *C. vulgaris* 109 DNA-fragments were obtained and 42 of them were polymorphic (38.5%). Jacquard distances (D_J) between the samples of *C. vulgaris* culture (cultures are grown on the media with different elements compositions and control (standard conditions) were 0.232 (only selenite), 0.206 (selenite and zinc) and 0.300 (selenite and chromium). **Conclusions.** Probably the genetic modifications of *C. vulgaris* cells are caused by the additional introduction of the microelements into the culture medium. The genetic polymorphism of the algae grown on media with various trace elements and their combinations was like the genetic polymorphism of the unicellular green algae grown in the natural conditions. It indicates the absence of significant genotoxic effects of the trace elements and high metabolic and genetic plasticity of algal culture.

Key words: *Chlorella vulgaris*, microelements, ISSR- and IRAP-PCR, genetic polymorphism, Jacquard distance

Лектин, специфічний до N-ацетилнейрамінової кислоти, з червоної водорості *Gracilaria canaliculata* Sonder та його антибактеріальна активність

Ле Дін Хунг, Во Ті Дьє Транг

Інститут технологічних досліджень і застосування Нхаранга,

В'єтнамська академія науки і техніки,

вул. Вунг Вуонг, 2, Намранг, В'єтнам

ledinhhungims@yahoo.co.uk

vtrang47@gmail.com

Надійшла до редакції 11.11.2020. Після доопрацювання 26.01.2021. Підписана до друку 11.02.2021.

Опублікована 29.06.2021

Реферат. Наведено результати вивчення лектину, виділеного з морської червоної водорості *Gracilaria canaliculata* (GCL). Процедура ізоляції лектину полягала у поєднанні водної екстракції та осадження з використанням етанолу, а також методів іонообмінної та фільтраційної хроматографії. Лектин дав одну смужку з молекулярною масою 22000 Да як в умовах невідновлення, так і відновлення SDS-PAGE, що вказує на те, що GCL є мономірним білком. Гемаглютинація GCL була стабільною при pH 3–10, температурі до 60 °C; на неї не впливали ні наявність ЕДТА, ні додавання двовалентних катіонів. Лектин GCL мав високу спорідненість до N-ацетилнейрамінової кислоти завдяки взаємодії з ацетамідогрупою в екваторіальному положенні C2 цих залишків цукру. Це свідчить про те, що GCL є специфічним для N-ацетилнейрамінової кислоти. Крім того, GCL пригнічував ріст патогенних бактерій людини та креветок, *Staphylococcus aureus* та *Vibrio alginolyticus*, хоча це не впливало на ріст *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio parahaemolyticus* та *V. harveyi*. *Gracilaria canaliculata* може стати перспективним джерелом цінних лектинів для використання в якості антибактеріальних засобів.

Ключові слова: антибактеріальна активність, специфічність зв'язування вуглеводів, *Gracilaria canaliculata*, лектин, червона водорість

© Ле Дін Хунг, Во Ті Дьє Транг, 2021

Вступ

Лектини – це білки (або глікопротеїни), які специфічно та зворотно зв'язуються з вуглеводами, що призводить до аглютинації клітин або осадження полісахаридів та глікокон'югатів. Лектини повсюдно поширені в біосфері, різноманітні за структурою та біологічними функціями, що в основному залежить від організмів, що їх продукують. Вивчення властивостей лектинів щодо вуглеводного зв'язування надзвичайно важливе не тільки для з'ясування їх біологічної ролі, але й можливого застосування як вуглеводних зондів або ліків (Sharon, Lis, 2003).

Нещодавно деякі лектини, виділені з еукаріотичних морських водоростей, привернули увагу вчених як потенційні джерела нових речовин з противірусною (BIL, SARS-CoV та віруси грипу) та протипухлинною активністю (O'Keefe et al., 2010; Sato et al., 2011a, b, 2015; Hirayama et al., 2016; Mu et al., 2017; Chaves et al., 2018a; Barre et al., 2019, 2020; Hung, Trinh, 2020; Sohrab et al., 2020). Це обумовлено їхньою здатністю зв'язувати вуглеводні структури, присутні на глікопротеїновій оболонці вірусу або на поверхнях ракових клітин, блокуючи потрапляння вірусів у клітини-господарі або інгібуючи ріст ракових клітин. Таким чином, лектини морських водоростей можуть стати новим джерелом противірусних та протипухлинних сполук для використання у медичній практиці.

N-ацетилнейрамінові кислоти – це група сполук, що знаходяться переважно на невідновлюваному кінці олігосахаридних ланцюгів на глікопротеїнах та гліколіпідах, відіграючи важливу роль у хімічному та біологічному різноманітті глікокон'югатів. Специфічна для типу клітин експресія глікозилтрансфераз, особливо сіалілтрансфераз (Van den Eijnden, Joziase, 1993), призводить до специфічних моделей сіалілювання олігосахаридів, які можна розглядати як ключові детермінанти у складі клітин. Вражаючи відмінності були виявлені в моделях сіало-глікозилювання у клітинах під час розвитку, активації, старіння та онкогенезу (Schauer et al., 1995). Специфічні лектини N-ацетилнейрамінової кислоти можуть застосовуватися як специфічні зонди для дослідження ролі вуглеводів клітинної поверхні під час розвитку, диференціації та злоякісної трансформації клітин, як це показано для інших типів рецепторів цукру. Ці лектини можуть бути використані як потужні засоби для очищення, характеристики, вивчення розподілу та локалізації багатьох біомолекул, що містять N-ацетилнейрамінову кислоту (Sharon, Lis, 1989; Zeng, Gabius, 1992).

В даній статті розглядається специфічність зв'язування N-ацетилнейрамінової кислоти та антибактеріальна активність нового лектину, виділеного з червоної водорості *Gracilaria canaliculata*. Встановлена можливість застосування лектину (ів) з морських водоростей.

Матеріали та методи

Матеріалом для роботи слугували таломі червоної водорості *Gracilaria canaliculata* (Sonder, 1871), зібрані в провінції Нінтуань (В'єтнам) у квітні 2018 р. Зразки були доставлені до лабораторії, де зберігалися при 20 °С. В роботі використовували попередньо упаковані колонки Sephacryl S-200 (1,6 × 60 см) та швидкоплинну іонообмінну хроматографічну колонку DEAE Sepharose (1,6 × 20 см) від GE Healthcare (Швеція). Кров тварин отримували з Інституту вакцин (Натранг, В'єтнам). Моносахариди (D-ксилоза, D-глюкоза, D-манноза, D-галактоза, N-ацетил-D-глюкозамін, N-ацетил-D-маннозамін, N-ацетил-D-галактозамін) та глікопротеїди (трансферин, фетуїн, свинячий тиреоглобулін та муцин свинячого шлунку, тип III) придбані у Sigma Chemical Co. Маннан дріжджів, N-ацетил-нейрамінова кислота отримані від Nakarai Chemical Co.

Екстракція та очищення лектину. Зразки водоростей подрібнювали до порошкоподібного стану, екстрагували 4-кратним об'ємом 20% холодного етанолу і витримували при 4 °С протягом 18 год при періодичному перемішуванні. Суміш центрифугували при 6000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С. Супернатант збирали та досліджували на гемаглютинаційну активність. До супернатанту додавали абсолютний холодний етанол (-20 °С) для досягнення кінцевої концентрації 83%, суміш витримували при 4 °С протягом ночі. Осад збирали центрифугуванням при 6000 об./хв. протягом 20 хв при 4 °С. Гранулу тричі промивали холодним абсолютним етанолом (-20 °С), центрифугували при 6000 об/хв протягом 20 хв при 4 °С і ретельно діалізували проти 20 мМ карбонатного буфера (рН 9,0). Недіалізуючу фракцію наносили на швидкоплинну іонообмінну хроматографічну колонку DEAE Sepharose (1,6 × 20 см), збалансовану вищезазначеним буфером. Незв'язані білки та пігменти елюювали буфером зі швидкістю потоку 10,0 мл · хв⁻¹ доти, поки стоки колонки не показали поглинання менше 0,002 при 280 нм, лектин елюювали 0,5 М NaCl у 20 мМ карбонатному буфері, рН 9,0; активні фракції об'єднували, концентрували ультрафільтрацією і діалізували проти 50 мМ фосфатного буфера, що містив 150 мМ NaCl (рН 7,0). Концентрат піддавали гель-фільтрації на колонці Sephacryl S-200 (1,6 × 60 см), збалансованій 50 мМ фосфатним буфером, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,0). Колонку елюювали тим же буфером зі швидкістю потоку 0,8 мл · хв⁻¹ і збирали активні фракції. Елюат контролювали при 280 нм на предмет поглинання білка та активності гемаглютинації за допомогою еритроцитів кроликів, оброблених трипсином. Активні фракції об'єднували і піддавали подальшому аналізу.

Приготування 2%-ї суспензії нативних або оброблених ферментами еритроцитів. Кожен зразок крові промивали 3-5 разів 50 об'ємами 150 мМ NaCl. Після промивання готували 2%-ну суспензію еритроцитів (об./об.) у

20 мМ фосфатному буфері, що містить 150 мМ NaCl (pH 7,2), і використовували як природні еритроцити. Оброблені трипсином або папаїном еритроцити готували наступним чином. Одну десяту об'єму 0,5% (мас./об.) розчину трипсину або папаїну додавали до 2%-ої суспензії еритроцитів, потім суміш інкубували при 37 °C протягом 60 хв. Після інкубації еритроцити промивали 3–5 разів сольовим розчином і готували 2%-ну суспензію (об/об) оброблених трипсином або папаїном еритроцитів, як зазначено вище (Hori et al., 1986).

Аналіз гемаглютинації проводили методом мікротитрування на 96-лунковій V-пластині мікротитру (Hori et al., 1986). Спочатку готували 25 мкл кількості послідовних двократних розведень досліджуваного розчину в 20 мМ фосфатному буфері, що містить 150 мМ NaCl (pH 7,2), на мікропланшетному V-планшеті. У кожную лунку додавали 25 мкл 2%-ої суспензії еритроцитів, суміш обережно струшували та інкубували при кімнатній температурі протягом 2 год. Позитивний результат свідчив про утворення рівномірного шару коагулянту над поверхнею лунки. З іншого боку, на негативний результат випробування вказувало утворення дискретної «кнопки» на дні лунки. Активність гемаглютинації виражалася як титр, зворотній найвищому дворазовому розведенню, при якому спостерігали позитивну гемаглютинацію.

Тест на інгібування гемаглютинації проводили за допомогою 2%-ої (об./об.) суспензії оброблених трипсином еритроцитів кроликів (Hori et al., 1986). Всі досліджувані інгібітори розчиняли у 150 мМ NaCl при початковій його концентрації 100 мМ для моносахаридів та 2000 мкг/мл для глікопротеїдів. Спочатку готували розчин об'ємом 25 мкл послідовно дворазовим розведенням цукру або глікопротеїну в 20 мМ фосфатного буфера, що містить 150 мМ NaCl (pH 7,2). У кожную лунку додавали рівний об'єм розчину лектину (4 дози аглютинації), приготованого в 20 мМ фосфатного буфера, що містить 150 мМ NaCl (pH 7,2), планшет обережно перемішували, витримували при кімнатній температурі протягом 1 год. Нарешті, 25 мкл 2%-ї суспензії оброблених трипсином еритроцитів кроликів додавали до кожної лунки, планшет обережно струшували та інкубували додатково 1 год. Інгібування спостерігали макроскопічно, а інгібуючу активність виражали як найнижчу концентрацію цукру або глікопротеїну, при якій було досягнуто повне інгібування гемаглютинації.

Вплив температури, рН та іонів металів на активність гемаглютинації. Для вивчення впливу температури на активність гемаглютинації кожен розчин лектину нагрівали за різних температур (30–100 °C) протягом 30 хв, потім негайно охолоджували на льоду. Для вивчення впливу рН на активність гемаглютинації кожний розчин лектину діалізували при 4 °C протягом ночі на 100 мл буферів

концентрацією 50 мМ при рН 3–10, а потім діалізували на 150 мМ розчину NaCl. Були використані наступні буфери: ацетатний буфер для рН 3–5, фосфатний буфер для рН 6–7, і *трис*-HCl буфер для рН 8–10. Для вивчення впливу двовалентних катіонів на активність гемаглютинації розчин лектину діалізували при 4 °С протягом ночі на 100 мл EDTA концентрацією 50 мМ з подальшим діалізом на 20 мМ фосфатного буфера, що містить 150 мМ NaCl (рН 7,5). Активність гемаглютинації визначали за відсутності або присутності CaCl₂. Активність гемаглютинації визначали за допомогою оброблених трипсином еритроцитів кроликів (Hori et al., 1986).

Вміст білка визначали за методом Lowry et al. (1951), використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт. Поглинання при 280 нм також використовували для оцінки вмісту білка в хроматографії.

Молекулярну масу очищеного лектину визначали за допомогою електрофорезу додецилсульфатом натрію в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). Зразки для SDS-PAGE денатурували при 100 °С протягом 5 хв з 2%-ним 2-меркаптоетанолом або без нього, потім електрофорували з використанням 10%-го гелю (Laemmli, 1970). Після електрофорезу гель фарбували Coomassie Brilliant Blue R-250 для білків.

Антибактеріальна активність. Її визначали за допомогою процедури розведення розчину лектину за методом Charungchitrak et al. (2011). Дію лектину випробовували на трьох видах патогенних бактерій морських креветок (*Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* та *V. Parahaemolyticus*) і трьох видах патогенних бактерій людини (*E. cloacae*, *E. coli* та *S. Aureus*). Бактерії вирощували на стерилізованому середовищі, що містить поживний бульйон і дріжджовий солодовий відвар, та інкубували протягом ночі в шейкері при 37 °С. Концентрацію бактерій у клітинах визначали шляхом вимірювання каламутності суспензії при 600 нм і перетворювали на колонієутворюючі одиниці (10⁵–10⁶ КУО/мл) за допомогою калібрувальної кривої. GCL (скорочення від *G. canaliculata* lectin) готували в різних дозах у фосфатному буфері, що містить 150 мМ NaCl (PBS). До кожного розведення додавали суспензію бактерій (OD₆₀₀ = 0,47) у середовищі, суміші обережно струшували та інкубували при 37 °С протягом 24 год. Після інкубації каламутність реакційних розчинів вимірювали при 600 нм як індекс росту бактерій. Фосфатний буферний розчин замість GCL як негативний контроль досліджували за схемою, описаною вище. Інгібуючу активність GCL щодо бактерій також визначали у присутності N-ацетилнейрамінової кислоти. GCL (200 мкг/мл) попередньо обробляли N-ацетилнейраміновою кислотою (100 мМ) протягом 2 год, суміш досліджували так, як описано вище. Експерименти проводились у трьох повторностях.

Статистичний аналіз. Усі результати були підтверджені трьома незалежними експериментами. Статистика представлена як середнє значення $\pm$ SEM. Статистичну значимість аналізували за допомогою односторонньої ANOVA з подальшим пост-хок-тестом Тукі. Відмінності вважали суттєвими, коли $P < 0,05$. Значення IC50 розраховані за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism, версія 5.00.

Результати та обговорення

Екстракція та очищення лектину. Сирий екстракт *G. canaliculata* сильно аглютинував еритроцити кроликів, овець та курей, оброблені трипсином та папаїном (табл. 1). Ці результати узгоджуються з іншими даними переважно щодо еритроцитів тварин про їх аглютинацію екстрактами лектину морських водоростей (Hori et al., 1990; Freitas et al., 1997; Hung et al., 2009, 2012). З етанолового екстракту, після 83%-го випадання холодного етанолу та діалізу, осад давав один активний пік в іонообмінній хроматографії на швидкоплинній колонці DEAE Sepharose (рис. 1, *a*).

Таблиця 1. Активність гемаглютинації сирого екстракту з *Gracilaria canaliculata*

Титр гемаглютинації з еритроцитами								
кролика			вівці			курки		
N ^a	T ^b	P ^c	N	T	P	N	T	P
d	128	1024	-	512	512	-	128	128

N^a – нативні еритроцити; T^b – оброблені трипсином еритроцити; P^c – оброблені папаїном еритроцити; “d” – відсутність гемаглютинації.

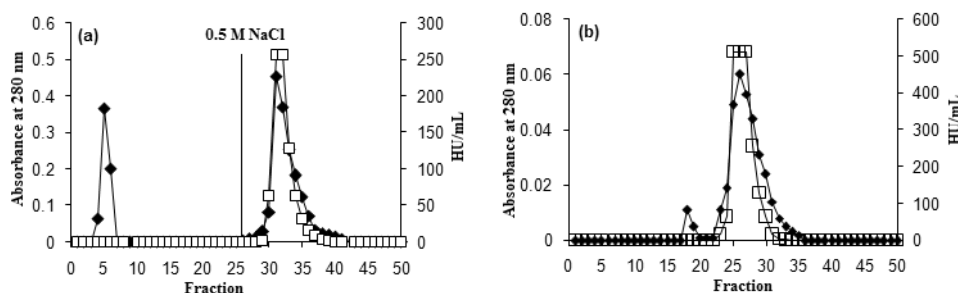


Рис. 1: *a* – іонообмінна хроматографія фракції осаду, отриманого з неочищеного екстракту *Gracilaria canaliculata* на швидкоплинній колонці DEAE Sepharose; *b* – гелева хроматографія на колонці Sephacryl S-200 активного піку, отриманого за допомогою іонообмінної хроматографії. Фракції збирали та вимірювали при поглинанні 280 нм (—◆—) щодо білка та активності гемаглютинації (—□—) з обробленими трипсином еритроцитами кролика. HU – одиниця гемаглютинації

Активний пік далі розділяли на два піки в гель-хроматографії на колонці Sephacryl S-200. Перший пік (I) не виявляв активності гемаглютинації, тоді як другий пік (II) виявляв сильну активність (рис. 1, б). Таким чином, очищений лектин позначався як GCL. Результати очищення наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Результати очищення лектину з *Gracilaria canaliculata*

Етап екстракції та очищення	Загальний білок, мг	Загальна активність*, HU	Питома активність, HU мг ⁻¹	Вихід, %
Екстракція	156,9	58880	375,3	100
Осадження етанолом	23,0	46080	2003,4	78,3
Іонний обмін	8,6	17536	2039,0	29,8
Гелева фільтрація	7,0	14336	2048,0	24,3

* Загальна активність виражається як титр, помножений на об'єм.

Визначення молекулярної маси. Молекулярна маса GCL становила 22000 Da як у відновлюваних, так і невідновлюваних SDS-PAGE умовах (рис. 2), що вказує на те, що GCL є мономерним білком. Подібні результати приведені щодо лектинів, які продукують представники роду *Gracilaria* Greville, таких як Granin-BP із *G. bursa pastoris* (Okamoto et al., 1990), GCL із *G. cornea* (Lima et al., 2005) та GOL із *G. ornata* (Leite et al., 2005), всі вони були мономерними білками.

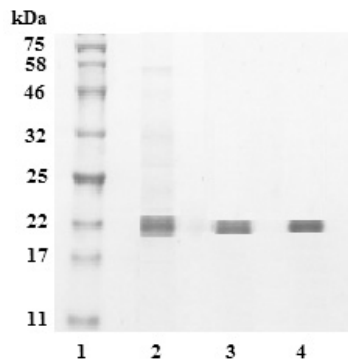


Рис. 2. SDS-PAGE електрофорез GCL, виділеного із червоної водорості *Gracilaria canaliculata*. SDS-PAGE проводили з використанням 10%-го поліакриламідного гелю. Білкові смужки фарбували реагентом Coomassie Brilliant blue R-250. Доріжка 1, суміш еталонних білків; доріжка 2, активні фракції, отримані в результаті іонообмінної хроматографії; доріжка 3, активні фракції, отримані в результаті гель-фільтрації в невідновлюваному стані; доріжка 4, активні фракції, отримані при гель-фільтрації у відновлювальному стані β-меркаптоетанолом

Вплив температури, рН та іонів металів на активність гемаглютинації. Активність гемаглютинації GCL була стабільною при нагріванні протягом 30 хв при 60 °С, коли зберігалася 100% його гемаглютинаційної активності; якщо температура інкубації перевищувала 60 °С, ця активність поступово знижувалася. Активність гемаглютинації GCL була стабільною в широкому діапазоні рН 3–10 і на неї не впливала ні присутність ЕДТА, ні додавання двовалентних катіонів, що вказує на те, що лектин не потребує металу для біологічної активності. Повідомлялося про термостабільну та незалежну від металів діяльність гемаглютинації для багатьох лектинів з морських водоростей (Hori et al., 1990; Freitas et al., 1997; Hung et al., 2009, 2012, 2015).

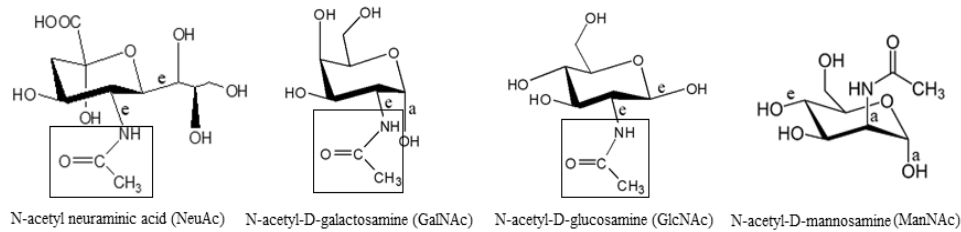
Тест на інгібування гемаглютинації. Активність гемаглютинації GCL не пригнічувалась моносахаридами (D-глюкозою, D-маннозою, D-галактозою, D-ксилозою, N-ацети-D-маннозаміном) та глікопротеїнами – трансферином, фетуїном та дріжджовими маннанами (табл. 3), але сильно інгібувалася N-ацетилнейраміновою кислотою, N-ацетил-D-галактозаміном та N-ацетил-D-глюкозаміном, що містять ацетамідогрупи при екваторіальному C2-положенні цих цукрів. При цьому активність гемаглютинації не пригнічувалася N-ацетил-D-маннозаміном, що має ацетамідо-групу при осьовому положенні C2 залишку цукру (рис. 3).

Стосовно глікопротеїнів слід зазначити, що активність гемаглютинації GCL не пригнічувалась трансферином, що містить лише складні N-глікани, та фетуїном, що містить як N-глікани складного типу, так і O-глікани. Дріжджовий маннан, що містить N-глікани з високим вмістом манози з (α 1–6)-зв'язком у своїй основі та (α 1–3)-зв'язком у бічних ланцюгах, не виявляв жодної інгібуючої активності навіть при концентрації 2 мг/мл, що вказує на те, що GCL не міг розпізнати (α 1–6) та (α 1–3)-пов'язані залишки маннози у структурах маннану дріжджів. Свинячий тиреоглобулін інгібував активність гемаглютинації GCL (рис. 3). Цей глікопротеїн містить олігосахариди двох типів – високоманозного (одиниця А-типу; Tsuji et al., 1981) і складного (одиниця В-типу; Yamamoto et al., 1981). Серед одиниць типу В основні N-глікани містять щонайменше 9 різних структур, що складаються з моно- та дисіальованих (α 1–6)-фукозильованих дво-, трикутних структур, що закінчуються або (α 2–3), або (α 2–6)-пов'язаними залишками N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc), тому GCL може розпізнавати розірвані або (α 2–3), або (α 2–6)-зв'язані залишки N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc) у структурах свинячого тиреоглобуліну.

Найсильнішим інгібітором гемаглютинуючої активності GCL виявився муцин свинячого шлунку, що містить O-глікани. Структурна мінливість O-зв'язаних гліканів базується на залишку ядра GalNAc α 1-, який може бути додатково заміщений (α 2–6) кінцевими залишками N-ацетилнейрамінової кислоти (NeuAc) (див. рис. 3) (Wopereis et al.,

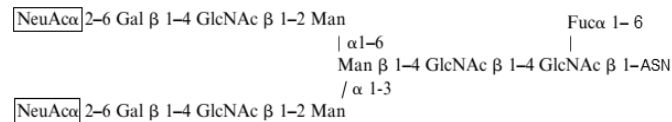
2006) . Інгібування муцином, пов'язане зі специфічністю зв'язування NeuAc, показало, що GCL є специфічним для NeuAc через взаємодію між групами лектину та ацетамідо в екваторіальному C2-положенні кінцевих залишків NeuAc в О-гліканах.

Monosaccharides



N-Glycoproteins

Porcine thyroglobulin



O-Glycoproteins

Mucin

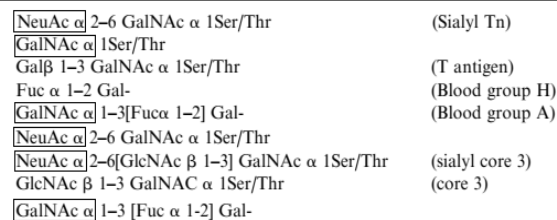


Рис. 3. Можливі епітопи, розпізнані лектином GCL з червоної водорості *Gracilaria canaliculata*, показані в прямокутниках. Man – манноза; NeuAc – N-ацетилнейрамінова кислота; GalNAc – N-ацетил-D-галактозамін; GlcNAc – N-ацетил-D-глюкозамін; Gal – галактоза; Fuc – фукоза; ASN – аспарагін; Ser/Thr – серін/треонін

GCL червоної водорості *G. canaliculata* пригнічував ріст патогенних бактерій людини та креветок, *S. aureus* та *V. alginolyticus*, хоча не впливав на ріст кишкової палички, *E. cloacae*, *V. parahaemolyticus* та *V. harveyi*. При дозах 0,8 та 4,0 мкг/мл GCL не знижував життєздатність бактерій *S. aureus* та *V. alginolyticus* до значного рівня порівняно з контролем при 0 мкг GCL відповідно (рис. 4).

GCL у дозах 20, 100 та 200 мкг/мл показав, що зменшення росту бактерій спостерігається на рівні 54,7; 25,9 та 20,8% для *S. aureus* ($P < 0,05$) та 62,8; 27,2 і 21,9% для *V. alginolyticus* ($P < 0,05$) відповідно порівняно з контролем при 0 мкг GCL (див. рис. 4).

Таблиця 3. Тест на інгібування гемаглютинації лектину з *Gracilaria canaliculata* (GCL)

Речовина	МІК*
Цукри, мМ	
D-галактоза	–
N-ацетил-D-галактозамін	12,5
D-глюкоза	–
N-ацетил-D-глюкозамін	25,0
D-манноза	–
N-ацетил-D-маннозамін	–
N-ацетилнейрамінова кислота	6,25
D-ксилоза	–
Глікопротеїни, мкг/мл	
Трансферин	–
Фетуїн	–
Маннан дріжджів	–
Свинячий тиреоглобулін	15,6
Муцин свинячого шлунку	0,49

*МІК – мінімальна інгібуюча концентрація; «–» – відсутність інгібування при 100 мМ для моносахаридів та 2000 мкг/мл для глікопротеїдів.

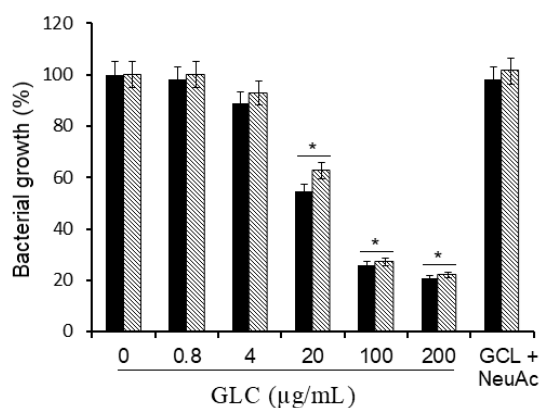


Рис. 4. Вплив GCL на розмноження бактерій. Бактерії обробляли різними дозами GCL. GCL + N-ацетилнейрамінова кислота (NeuAc) – бактерії обробляли сумішшю GCL та NeuAc. Зростання бактерій (%) вимірювали при 600 нм. Золотистий стафілокок (■) та *Vibrio alginolyticus* (▨). Середнє значення $\pm$ SEM ($n = 3$). * $P < 0,05$ для бактерій, оброблених GCL, порівнювали з контролем при 0 мкг/мл GCL.

GCL виявляв антибактеріальну дію в залежності від дози зі значеннями IC50 *S. aureus* ($66,4 \pm 3,2$ мкг/мл) та *V. alginolyticus* ($72,7 \pm 3,4$ мкг/мл). Активність пригнічення росту GCL щодо *S. aureus* та *V. alginolyticus* була втрачена у присутності N-ацетилнейрамінової кислоти, яка була найсильнішим інгібітором гемаглютинації з GCL. Результати свідчать про те, що *S. aureus* та *V. alginolyticus* мають О-гліканову структуру (структури) типу NeuAc/GalNAc на клітинній поверхні, яка може відповідати як рецептор(и) для GCL. Повідомлялося про видоспецифічну антибактеріальну активність для лектинів червоних водоростей *Eucheuma serra*, *Galaxaura marginata* (Liao et al., 2003), *Eucheuma denticulatum* (Hung et al., 2015), *Gracilaria fisheri* (Boonsri et al., 2017) та *Meristiella echinocarpa* (Chaves et al., 2018b). Інформація щодо водоростевих лектинів допоможе з'ясувати механізм зараження морських патогенів і захистити риб та молюсків від зараження.

Лектини, специфічні для N-ацетилнейрамінової кислоти, знайдені у вірусів (віруси грипу, параміксовіруси та коронавіруси) (Schultze et al., 1991; Suzuki, 2005), бактерій (*Escherichia coli* та *Helicobacter pylori*) (Hanisch et al., 1993; Unemo et al., 2005), безхребетних і хребетних тварин (Iwanaga, Lee, 2005), рослин (Mandal, Mandal, 1990) та різних джерел організму (Lehmanna et al., 2006). Однак біологічна роль специфічних лектинів N-ацетилнейрамінової кислоти все ще залишається невідомою, тому необхідні детальні дослідження для аналізу взаємодії лектинів, що зв'язують N-ацетилнейрамінову кислоту, з їх контррецепторами, а також для з'ясування отриманих сигналів, що контролюють їхню функцію.

Висновки

Лектин *Gracilaria canaliculata* пригнічує ріст патогенних бактерій людини та морських організмів, *Staphylococcus aureus* та *Vibrio alginolyticus* залежно від дози. Одержано нові відомості стосовно властивостей лектину *G. canaliculata*, включаючи молекулярну масу, мономерну форму, профіль інгібування гемаглютинації та стабільність у широкому діапазоні pH та температури. GCL специфічний для N-ацетилнейрамінової кислоти, отже ймовірно, він може мати також інші корисні властивості. Це дослідження свідчить про те, що дана водорість може бути не тільки потенційно корисною як аналітичний інструмент при вивченні біологічних функцій сіалоглікокон'югатів, але й стати об'єктом дослідження для пошуку нових лікарських засобів.

Це дослідження було підтримане В'єтнамським національним фондом розвитку науки і техніки (NAFOSTED), грант № 106-YS.06-2015.16

Список літератури

- Barre A., Simplicien M., Benoist H., Van Damme ElsJM., Rougé P. 2019. Mannose-specific lectins from marine algae: Diverse structural scaffolds associated to common virucidal and anti-cancer properties. *Mar. Drugs*. 17(8): 440. <https://doi.org/10.3390/md17080440>
- Barre A., Van Damme ElsJM., Simplicien M., Benoist H., Rougé P. 2020. Man-Specific, GalNAc/T/Tn-Specific and Neu5Ac-Specific Seaweed Lectins as Glycan Probes for the SARS-CoV-2 (COVID-19) Coronavirus. *Mar. Drugs*. 18(11): 1–543. <https://doi.org/10.3390/md18110543>
- Boonsri N., Rudtanatip T., Withyachumnarnkul B., Wongprasert K. 2017. Protein extract from red seaweed *Gracilaria fisheri* prevents acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) infection in shrimp. *J. Appl. Phycol.* 29(3): 1597–1608.
- Charungchittrak S., Petsom A., Sangvanich P., Karnchanatat A. 2011. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food Chem.* 126(3): 1025–1032.
- Chaves R.P., da Silva S.R., Neto L.G.N., Carneiro R.F., da Silva A.L.C., Sampaio A.H. 2018a. Structural characterization of two isolectins from the marine red alga *Solieria filiformis* (Kützinger) P.W. Gabrielson and their anticancer effect on MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 107: 1320–1329.
- Chaves R.N., da Silva S.R., da Silva J.P.F.A., Carneiro R.F., de Sousa B.L., Abreu J.O., Carvalho F.C.T., Rocha C.R.C., Farias W.R.L., de Sousa O.V., Silva A.L.C., Sampaio A.H., Nagano C.S. 2018b. *Meristiella echinocarpa* lectin (MEL): a new member of the OAAH-lectin family. *J. Appl. Phycol.* 30: 2629–2638. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1473-7>
- Freitas A.L.P., Teixeira D.I.A., Costa F.H.F., Farias W.R.L., Lobato A.S.C., Sampaio A.H. 1997. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. *J. Appl. Phycol.* 9: 495–501.
- Hanisch F.G., Hacker J., Schroten H. 1993. Specificity of S fimbriae on recombinant *Escherichia coli*: preferential binding to gangliosides expressing NeuGc alpha (2-3)Gal and NeuAc alpha (2-8)NeuAc. *Infect. Immun.* 61(5): 2108–2115.
- Hirayama M., Shibata H., Imamura K., Sakaguchi T., Hori K. 2016. High-mannose specific lectin and its recombinants from a carrageenophyta *Kappaphycus alvarezii* represent a potent anti-HIV activity through high-affinity binding to the viral envelope glycoprotein gp120. *Mar. Biotechnol.* 18(1): 144–160
- Hori K., Miyazawa K., Fusetani N., Hashimoto K., Ito K. 1986. Hypnins, low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta.* 873: 228–236.
- Hori K., Miyazawa K., Ito K. 1990. Some common properties of lectins from marine algae. *Hydrobiologia.* 204/205: 561–566.
- Hung L.D., Trinh P.T.H. 2020. Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*. *J. Nat. Med.* 75(1): 223–231. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01455-0>
- Hung L.D., Hori K., Nang H.Q. 2009. Screening and preliminary characterization of hemagglutinins in Vietnamese marine algae. *J. Appl. Phycol.* 21: 89–97.

- Hung L.D., Ly B.M., Trang V.T.D., Ngoc N.T.D., Hoa L.T., Trinh P.T.H. 2012. A new screening for hemagglutinins from Vietnamese marine macroalgae. *J. Appl. Phycol.* 24: 227–235.
- Hung L.D., Hirayama M., Ly B.M., Hori K. 2015. Purification, primary structure, and biological activity of high-mannose N-glycan-specific lectin from the cultivated *Eucheuma denticulatum*. *J. Appl. Phycol.* 27: 1657–1669.
- Iwanaga S., Lee B.L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38: 128–150.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
- Leite Y.F.M.M., Silva L.M.C.M., Amorim R.C.N., Freire E.A., Jorge D.M.M., Grangeiro T.B. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Biochim. Biophys. Acta*. 1724(1–2): 137–145.
- Lehmann F., Tiralongo E., Tiralongo J. 2006. Sialic acid-specific lectins: occurrence, specificity and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 1331–1354.
- Liao W.R., Lin J.Y., Shieh W.Y., Jeng W.L., Huang R. 2003. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 433–439.
- Lima M.E.P., Carneiro M.E., Nascimento A.E., Grangeiro T.B., Holanda M.L., Amorim R.C.N. 2005. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the Cattle Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Agric. Food Chem.* 53: 6414–6419.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Mandal C., Mandal C. 1990. Sialic acid binding lectins. *Experientia*. 46: 433–441.
- Mu J., Hirayama M., Sato Y., Morimoto K., Hori K. 2017. A novel high-mannose specific lectin from the green alga *Halimeda renshii* exhibits a potent anti-influenza virus activity through high-affinity binding to the viral hemagglutinin. *Mar. Drugs*. 15(8): 255. <https://doi.org/10.3390/md15080255>
- Okamoto R., Hori K., Miyazawa K., Ito K. 1990. Isolation and characterization of a new hemagglutinin from the red alga *Gracilaria bursa-pastoris*. *Experientia*. 46(9): 975–977.
- O’Keefe B.R., Giomarelli B., Barnard D.L., Shenoy S.R., Chan P.K.S., McMahon J.B. 2010. Broad-spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein Griffithsin against emerging viruses of the family *Coronaviridae*. *J. Virol.* 84(5): 2511–2521.
- Sato Y., Morimoto K., Hirayama M., Hori K. 2011a. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 405(2): 291–296.
- Sato Y., Hirayama M., Morimoto K., Yamamoto N., Okuyama S., Hori K. 2011b. High mannose-binding lectin with preference for the cluster of α 1–2-mannose from the green alga *Boodlea coacta* is a potent entry inhibitor of HIV-1 and influenza viruses. *J. Biol. Chem.* 286(22): 19446–19458.
- Sato Y., Morimoto K., Kubo T., Sakaguchi T., Nishizono A., Hirayama M., Hori K. 2015. Entry inhibition of influenza viruses with high mannose binding lectin ESA-2 from the red alga *Eucheuma serra* through the recognition of viral hemagglutinin. *Mar. Drugs*. 13(6): 3454–3465.

- Schauer R., Kelm S., Reuter G., Roggentin P., Shaw L. 1995. In: *Biology of the Sialic Acids*. Boston, MA: Springer. Pp. 7–67.
- Schultze B., Gross H.J., Brossmer R., Herrler G. 1991. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. *J. Virol.* 65(11): 6232–6237.
- Sharon N., Lis L. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*. 246(4927): 227–234.
- Sharon N., Lis H. 2003. In: *Lectins*. 2nd ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ. 450 p.
- Sohrab S.S., Suhail M., Kamal M.A., Ahmad F., Azhar E.I. 2020. The emergence of human pathogenic Coronaviruses: Lectins as antivirals for SARS-CoV-2. *Curr. Pharm. Des.* 26(41): 5286–5292. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200821120409>
- Suzuki Y. 2005. Sialobiology of influenza: Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28(3): 399–408.
- Tsuji T., Yamamoto K., Irimura T., Osawa T. 1981. Structure of carbohydrate unit A of porcine thyroglobulin. *J. Biochem.* 195(3): 691–699.
- Unemo M., Aspholm-Hurtig M., Ilver D., Bergstrom J., Boren T., Danielsson D., Susann T. 2005. The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J. Biol Chem.* 280(15): 15390–15397.
- Van den Eijnden D.H., Joiasse D.H. 1993. Enzymes associated with glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 711–721.
- Wopereis S., Lefeber D.J., Morava E., Wevers R.A. 2006. Mechanisms in protein O-glycan biosynthesis and clinical and molecular aspects of protein O-glycan biosynthesis defects: A Review. *Clin. Chem.* 52(4): 574–600.
- Yamamoto K., Tsuji T., Irimura T., Osawa T. 1981. The structure of carbohydrate unit B of porcine thyroglobulin. *J. Biochem.* 195(3): 701–713.
- Zeng F.Y., Gabius H.J. 1992. Sialic Acid-Binding Proteins: Characterization, Biological Function and Application. *Z. Naturforsch. C.* 47(9–10): 641–653.

Підписала до друку О.К. Золотарьова

Le Dinh Hung, Vo Thi Dieu Trang. 2021. **N-acetylneuraminic acid specific lectin and antibacterial activity from the red alga *Gracilaria canaliculata* Sonder.** *Algologia*. 31(2): 126–140

Nhatrang Institute of Technology Research and Application, Vietnam Academy of Science and Technology,
2, HungVuong Street, Nhatrang City, Vietnam

A new lectin from the marine red alga *Gracilaria canaliculata* (GCL) was isolated by a combination of aqueous ethanol extraction, ethanol precipitation, ion exchange and filtration chromatography. Lectin gave a single band with molecular mass of 22,000 Da in both non-reducing and reducing SDS-PAGE conditions, indicating that GCL is a monomeric protein. The

hemagglutination activities of GCL were stable over a wide range of pH from 3 to 10, temperature up 60 °C and not affected by either the presence of EDTA or addition of divalent cations. Lectin GCL had high affinity for N-acetylneuraminic acid through interacting with the acetamido group at equatorial C2 position of these sugar residues, suggesting that GCL is specific for N-acetylneuraminic acid. Furthermore, GCL inhibited the growth of human and shrimp pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio alginolyticus*, although it did not affect the growth of *Escherichia coli*, *Enterobacter cloace*, *Vibrio parahaemolyticus* and *V. harveyi*. The red alga *G. canaliculata* may promise to be a source of valuable lectins for application as antibacterial agents.

Key words: antibacterial activity, carbohydrate binding specificity, *Gracilaria canaliculata*, lectin, red alga

Комплекси діатомей верхнього пліоцену та їхнє значення для встановлення нижньої межі квартеру (південь Далекого Сходу)

Пушкар В.С.

*Далекосхідний геологічний інститут ДСВ РАН, Росія,
пр. 100 років Владивостоку, 159, Владивосток 690022, Росія
vlpushkar@mail.ru*

Надійшла до редакції 20.04.2021. Після доопрацювання 12.05. 2021. Підписана до друку 21.05.2021.
Опублікована 29.06.2021

Реферат. Рішенням Міжнародного союзу геологічних наук (Норвегія, 2009 р.), прийнятим за поданням Міжнародної комісії з стратиграфії, запропоновано встановити нижню межу квартеру на рівні 2,58 млн років. Таке рішення викликало бурхливу дискусію, яка вимагає серйозного обґрунтування нового положення стратиграфічної межі і включення гелазького ярусу пліоцену до складу квартеру, що може значно вплинути на розробку структури та ієрархії стратиграфічних підрозділів квартеру. Особливо гостро дискутується питання про критерії проведення нової межі, її уніфікації у різних географічних регіонах і регіональних геологічних стратотипах. Розглядається питання про критерії і правомірність проведення нової неоген-четвертинної межі у верхньокайнозойських континентальних відкладах Примор'я за діатомеями.

К л ю ч о в і с л о в а : квартер, пліоцен, гелазький ярус, шуфанський горизонт, палеоклімат, Примор'я

Вступ

Сьогодні особлива увага геологів, які займаються вивченням четвертинних відкладів, приділяється проблемі обґрунтування і критеріїв проведення нижньої межі квартеру на рівні 2,58 млн років і, отже, включення гелазького ярусу до структури його підрозділів. Це рішення, за поданням Міжнародної комісії з стратиграфії (ICS), було прийнято Міжнародним союзом геологічних наук (IUGS) в 2009 р., чому передувало бурхливе обговорення цієї проблеми на 33-му Міжнародному геологічному конгресі

© Пушкар В.С., 2021

(Осло, Норвегія, 2008 р.). Стратотип нижньої межі Гелазія – розріз Монте Сан Нікола (Сицилія) затверджено у 1996 р. На цьому рівні розташовується межа між палеомагнітними ортозонами Матуяма-Гаусс і започаткуванням 103-ї киснево-ізотопної стадії (Ogg, Pillans, 2008; Pillans, Gibbard, 2012).

У Росії проблема нижньої межі квартеру також бурхливо обговорювалася навесні 2011 р. За рекомендацією неогенової і четвертинної комісій Міжвідомчого стратиграфічного комітету (МСК) спільно з Комісією по вивченню четвертинного періоду РАН, межа між неогеном і кварталом була прийнята на рівні 2,58 млн років (Modern..., 2011). Таке рішення має дуже серйозні наслідки, оскільки пов'язане з проведенням геологічної великомасштабної зйомки і складанням нових регіональних карт четвертинних відкладів для пошукової геології. При виділенні самих критеріїв проведення межі регіональних підрозділів квартеру слід врахувати зауваження О.А. Світоча (2016) щодо співвідношення обсягів і положення меж ярусів Міжнародної стратиграфічної шкали (МСШ) і підрозділів регіональних шкал. На прикладі Великого Каспію (ВК) він показав, що нижні межі ярусів МСШ і регіоярису ВК, як і палеогеографічні ситуації, співвідносяться по-різному. Основними причинами таких невідповідностей можуть бути різновимірність, відмінності і ієрархія подій порівнюваних об'єктів – Світового океану і Каспійського регіону. Важливо враховувати також різні критерії виділення ярусів в МСШ і регіоярису ВК. При міжрегіональній кореляції стратиграфічних підрозділів, зокрема гелазького ярусу, завжди існуватимуть ускладнення, обумовлені різним ступенем комплексної вивченості, а в континентальних товщах – і фаціальною різноманітністю. Мабуть, такі ускладнення універсальні для будь-яких регіонів.

В офіційно прийнятій і затвердженій Регіональній стратиграфічній схемі палеогенових і неогенових відкладів півдня материкової частини Далекого Сходу (Decisions..., 1994) пліоценові відклади були включені до стратиграфічного об'єму суйфунського горизонту (суйфунська свита). Вважалося, що відклади суйфунської свити латерально заміщуються відкладами шуфанської свити з найбільш повними розрізами в районі Шуфанського плато. Пізніше стратиграфічний об'єм суйфунського горизонту був переглянутий і доведена його відповідність еоплейстоцену, тому шуфанський горизонт не може бути латеральним фаціальним аналогом суйфунському (Pavliutkin, Petrenko, 2010).

Власне шуфанська свита в стратотипічному розрізі (скв. 415, рис. 1) складена в нижній і верхній частинах потоками андезитобазальтів потужністю 25 і 13 м відповідно та міжбазальтовими глинами і пісками з прошарками туфодіатомітів (потужність 48 м), що утворилися в озерних умовах. Шуфанські відклади мають досить серйозне мікропалеонтологічне обґрунтування і радіометричні датування, що вказують на

їхню приналежність до пліоцену (Kovalenko, 1989; Pavliutkin, Petrenko, 2010), що унеможливило їх перенесення на еоплейстоценовий рівень. Такі часові протиріччя призвели до перегляду статусу шуфанської свити як фаціального аналога суйфунської свити і стала підставою для виділення однойменного регіонального шуфанського горизонту в стратиграфічній схемі неогену Примор'я (Pavliutkin, Petrenko, 2010). Перекривають відклади шуфанського горизонту червоноколірні товщі анненського горизонту, запропонованого Б.І. Павлюткіним і асоційованого ним зі гелазьким ярусом (Pavliutkin, Petrenko, 2010). Вище анненського горизонту залягають відклади суйфунської свити, добре охарактеризовані мікропалеонтологічними даними (карпологічний, спорово-пилковий і діатомовий аналізи), що відповідають еоплейстоценовому рівню. Палеомагнітні дослідження показали, що верхня частина відкладів анненського горизонту характеризується переважно зворотною залишковою намагніченістю. Це дає підставу розглядати можливий час її накопичення в одному з епізодів всередині ортозони Гаусс або в ранній період ортозони Матуяма (Pavliutkin, Petrenko, 2010).

Матеріали та методи

Найбільш повний розріз пліоцену (гаданий стратотип – розріз 4131) розташований в околицях с. Терехівка поблизу місця буріння скв. 415 (Пушкінська западина, координати: 43° 20 '25' 'п.ш. та 131° 52' 59 " с.д.) і нарізає розріз 4130 усть-суйфунської свити (рис. 1). Ці ж шари пліоцену прослідковуються в рівнях 4128 та 4129 біля західної околиці с. Червоний Яр (координати: 43° 41 '40' 'п.ш. та 131° 54' 54 " с.д.).

Осадова товща розрізу 4131 відома як кедрівська товща (Denisov, 1960). Саме цей розріз і пропонується вважати стратотипом горизонту, оскільки він досить повно охарактеризований викопною листовою флорою, даними спорово-пилкового і діатомового аналізів (Pavliutkin, Petrenko, 2010; Pushkar et al., 2019).

Відклади розрізу 4131 представлені знизу догори:

- | | |
|--|---------|
| 1. Глина щільна, синювато-сіра, в окремих прошарках алевроста | 5,6 м |
| 2. Піски світло-сірі, дрібнозернисті, хорошого сортування | 0,65 м |
| 3. Глина щільна, синювато-сіра, в окремих прошарках алевроста | 0,25 м |
| 4. Алевроліт світло-сірий, у верхній частині зі слідами ґрунту | 0,55 м |
| 5. Піски світло-сірі, дрібнозернисті, хорошого сортування, у верхній частині алеврості | 3,8 м |
| 6. Похований ґрунт з гумусовим й ілювіальним горизонтами | 0,5 м |
| Загальна потужність | 11,05 м |



Рис. 1. Схема розташування досліджених розрізів пліоцену Примор'я

Перекриваються відклади базальтовим покривом потужністю 0,7 м та алевролітами потужністю 1,1 м. Базальти верхнього потоку мають зворотню залишкову намагніченість, яка відповідає палеомагнітній ортозоні Matuyama (Alekseev, 1978).

Результати та обговорення

Виділені у відкладах шуфанської свити комплекси діатомей належать діатомовим зонам *Alveolophora tscheremissinovae* та *Aulacoseira praegranulata* var. *praeislandica* f. *praeislandica* (рис. 2). На межі міоцен-пліоцен також відзначено першу еволюційну появу *A. subarctica* (Müller) Haworth, *Pliocaenicus costatus* (Loginova, Lupikina et Khursevich) Flower, Ozornina et Kuzmina, *Stephanodiscus grandis* Khursevich et Loginova, *S. hantzschii* Grun. і *S. nativus* Lupikina, Khursevich, Ozornina. Хорошим маркером пліоцену відкладень служить масове трапляння *Alveolophora tscheremissinovae* Khursevich

Комплекс зони *A. tscheremissinovae* (нижній пліоцен, шари 1–3). Верхня межа зони проводиться по вимиранню виду-індексу. Вік 5,3–3,6 млн років. Комплекс діатомей характеризується *A. tscheremissinovae*, *A. praegranulata* var. *praeislandica* f. *praeislandica* (Jousé) Moiss., *Melosira undulata* (Ehr.) Kütz., *Ellerbeckia arenaria* f. *teres* (Brun) Crawford, *Fragilariforma bicapitata* (A.Mayer) Williams et Round, *Cymbella tumida* (Bréb.) Van Heurck і *Sellaphora americana* (Ehr.) Mann, *Cymbella australica* (A.S.) Cl. Вимерлих видів близько 10%. Спостерігається вище видове різноманіття, ніж у попередньому комплексі, а також участь теплолюбних видів, що відповідає незначному потеплінню клімату початку пліоцену.

Міжнародна стратиграфічна шкала			Местные стратиграфические подразделения (свиты)	Диадомовая зона	Стратиграфическое распределение диатомей
СЕРИЯ / ПОДСЕРИЯ	ЯРУС	ВРЕМЯ (млн. лет)			
ПЛЕЙСТОЦЕН	КАЛАБРИЙ	1.806	суйфунская		
	ГЕЛАЗИЙ	2.588	анненская	<i>Aulacoseira praegr anulata</i> var. <i>praeislandica</i> f. <i>praeislandica</i>	
	ПЬЯЧЕНЦА	3.600	шуйфанская	<i>Alveolophora tscheremissinovae</i>	
	ЗАНКЛИЙ	5.332			
МИОЦЕН	ВЕРХНИЙ	МЕССИНИЙ	усть-суйфунская	<i>Ellerbeckia kochii</i>	
		ТОРТОНИЙ			
	СРЕДНИЙ	СЕРРАВАЛИЙ	новокачалинская	<i>Alveolophora russica</i>	
		ЛАНГИЙ		<i>Alveolophora jouseana</i>	
		АКВИТАНИЙ	нежинская	<i>Actinocyclus lobatus</i>	
	НИЖНИЙ	23.03	синеутесовская	<i>Alveolophora bifaria</i>	

Рис. 2. Зональна діатомова шкала неогенових відкладів Примор'я (Pushkaret al., 2019) з незначними уточненнями

Комплекс зони *Aulacoseira praegr anulata* var. *praeislandica* f. *praeislandica* (верхній пліоцен, шари 4–6). Верхня межа відповідає рівню вимирання виду-індексу. Вік 3,6–2,58 млн років. Віковий комплекс, що відображає еволюційний етап у розвитку діатомей, представлений *A. praegr anulata* var. *praeislandica* f. *praeislandica* (Jousé) Moiss., *A. distans* (Ehr.) Simonsen, *A. praegr anulata* var. *praegr anulata* (Jousé) Moiss., *A. italica* (Kütz.) Simonsen, *Melosira undulata* var. *undulata* (Ehr.) Kütz.,

Ellerbeckia arenaria f. *teres* (Brun) Crawford, *Eunotia clevei* Grun., *Tetracyclus ellipticus* var. *lancea* (Ehr.) Hust. Вимерлих видів, крім грубопанцирних різновидів *Aulacoseira praegrnulata* (Jousé) Simonsen, немає. У відкладах суйфунської свити вже також немає грубо-панцирних *Aulacoseira*, що зближує цю флору із сучасною (Pavliutkin, Petrenko, 2010). Значно знижене видове різноманіття діатомей, відсутній помірно тепловодний елемент флори. Бентичні діатомеї превалюють (до 78%), що свідчить про посилення алювіального седиментогенеза порівняно з лімнічним. Комплекс відображає нову хвилю похолодання і стабілізацію холодних умов.

В екологічному відношенні два наведені вище комплекси відрізняються. Нижній комплекс характерний для озерних глибоководних фацій, засвідчить про домінування бентичної *Melosira undulata* var. *undulata*, яка мешкає переважно в глибоких озерних біотопах, а також наявність представників планктонних родів *Ellerbeckia* R.M.Crawford, *Cyclotella* Kützing) Brébisson, *Pliocenicus* Round & Håkansson і *Stephanodiscus* Ehrenberg. Присутність у комплексі тепловодних діатомей *Actinella brasiliensis* Grun., *Cymbella tumida* (Bréb.) Van Heurck і *Sellaphora americana* (Ehr.) Mann (до 41,3%) свідчить про відносно теплий клімат раннього пліоцену, що також підтверджують інші автори (Pavliutkin, Petrenko, 2010).

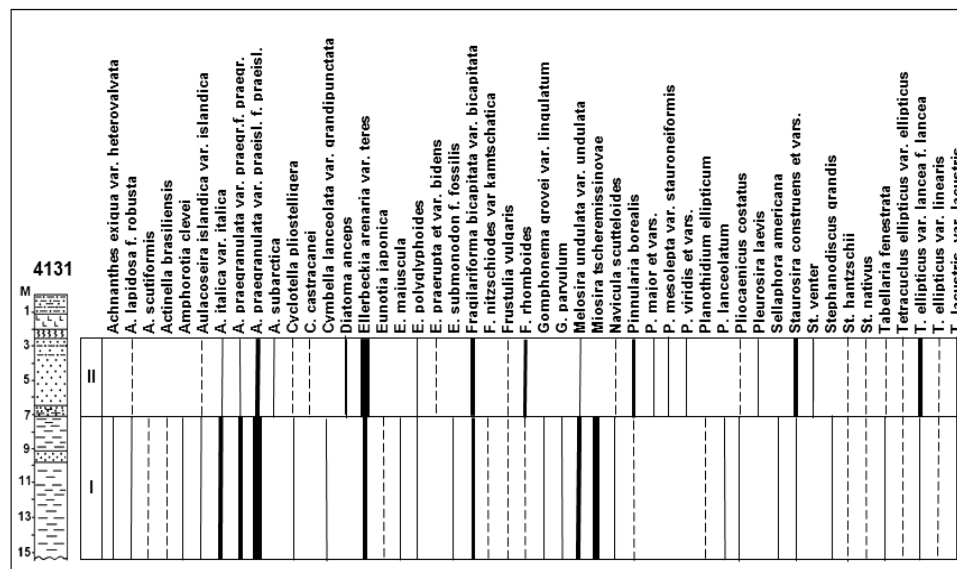


Рис. 3. Діатомова діаграма відкладів опорного розрізу пліоценових відкладів (розріз 4131, літологічний опис шарів див. в тексті)

Для верхнього комплексу характерне домінування більш мілководних представників роду *Aulacoseira* і відсутність тепловодних діатомей, що свідчить про зниження рівня води в озері і початок сильного глобального похолодання в пізньому пліоцені з максимальною фазою 2,58 млн років. В мусонній циркуляції домінує зимовий мусон. З цього моменту починається співіснування і експансія полярних льодовикових шапок (перехід планети з режиму "Green house" в режим "Ice house"), які визначили формування сучасної кліматичної системи Землі (Wang et al., 2003).

Аналогами описаних комплексів є діатомей відкладів розрізу 4129, розташованого на західній околиці с. Червоний Яр (див. рис. 1), який нарощує без слідів перерви розріз 4128 (усть-суйфунська свита).

Дані діатомового аналізу цілком відповідають даним спорово-пилкового аналізу (Pavliutkin, Petrenko, 2010). В осадовій товщі розрізу 4131 виділяються два спорово-пилкових комплекси.

Спорово-пилкові спектри нижньої частини розрізу (шари 1–3) характеризуються переважанням пилку покритонасінних над голонасінними. Серед покритонасінних помітну роль відіграє пилко широколистяних порід: *Castanea* (до 4,3%), *Carpinus* (до 6%), *Corylus* (до 3,6%), *Juglans* (до 5,1%), *Ulmus* (до 4,3%). Серед голонасінних домінує *Pinus* subg. *Haploxylon* (4–19,2%). Значно менше *Picea* sect. *Omorica* (1,4–2,3%) і представників *Taxodiaceae* (1,2–2,3%). Серед дрібнолистяних багато *Betula* (2,9%) та *Alnus* (до 19,3%).

Для верхнього комплексу (шари 4–6) характерна відсутність пилку широколистяних порід. Зустрічаються лише поодинокі пилкові зерна *Juglans*, *Carpinus*, *Corylus*, *Quercus*, *Fagus*, *Ulmus*, *Acer*, *Tilia*, *Syringa*, що робить спектр близьким до еоплейстоценових. Це дає підставу припускати, що осади у верхній частині були сформовані в епоху глобального похолодання в інтервалі 2,2–3,0 млн років з максимальною фазою, яка не поступається масштабністю останньому оледенінню планети на рівні 2,4–2,5 млн років (Pavliutkin, Petrenko, 2010).

Такі для пізнього кайнозою спектри відображають пліоценові коливання клімату, добре виражені на глобальних палеотемпературних кривих (Wang et al., 2003; Pavliutkin, Petrenko, 2010).

Висновки

Аналіз поширення діатомей у розрізах пізнього кайнозою показує, що до рівня анненського горизонту (геласький ярус) практично повністю зникають вимерлі види. Для відкладів діатомової зони *Aulacoseira praegranulata* var. *praeislandica* f. *praeislandica* чітко зазначається превалювання алювіального типу седиментогенезу і скорочення площі озernih басейнів. Похолодання пізнього пліоцену з вираженим темпе-

ратурним мінімумом на рівні близько 2,58 млн років досить яскраво відображено в екологічних структурах діатомових асоціацій (верхній комплекс) – переважають бентична аркто- і північно-бореальна флори. Для цього часу характерна також повна відсутність пилку широколистяних порід, а палеоландшафти стають близькими до еоплейстоценових. С цього моменту починається співіснування і експансія полярних льодовикових шапок (перехід планети з режиму "Green house" в режим "Ice house"), які визначили формування сучасної кліматичної системи Землі, що підкреслює глобальність палеокліматичної події. У літологічному плані для південної частини Примор'я з цією межею збігається підшва товщі красноцвітів анненського горизонту, яка відповідає підшві гелязького ярусу (2,58 млн років). Вікове зниження межі квартера до цього стратиграфічного рівня носить цілком обґрунтований характер.

Список літератури

- Alekseev M.N. 1978. *Anthropogene of the East Asia*. Moscow: Nauka. 2008. 108 p. [Алексеев М.Н. 1978. *Антропоген Восточной Азии*. М.: Наука. 208 с.]
- Decisions of the 4th Interdepartmental Stratigraphic Meeting on Precambrian and the Phanerozoic of the South of the Far East and Eastern Transbaikalia. 1994. Khabarovsk. 124 p. [Решения 4-го Межведомственного стратиграфического совещания по докембрию и фанерозою юга Дальнего Востока и Восточного Забайкалья. 1994. Ред. М.Т. Турбин. Хабаровск. 124 с.]
- Denisov E.P. 1960. To the question of the stratigraphy of the Upper Cenozoic formations of the Southwestern Primorye. *Rep. Far Eastern Branch Sib. Branch USSR Acad. Sci.* 12: 19–23. [Денисов Е.П. 1960. К вопросу о стратиграфии верхнекайнозойских образований Юго-Западного Приморья. *Сообщ. ДВФ СО АН СССР*. 12: 19–23].
- Kovalenko S.V. 1989. In: *The Cenozoic of the Far East*. Vladivostok: FEB RAS. Pp. 64–72. [Коваленко С.В. 1989. В кн.: *Кайнозой Дальнего Востока*. Владивосток: ДВО АН СССР. С. 64–72].
- Modern problems of the Neogene and Quaternary stratigraphy of Russia*. 2011. Ed. Yu.B. Gladenkov. Moscow: GEOS. 108 p. [Современные проблемы стратиграфии неогена и квартера России. 2011. Ред. Ю.Б. Гладенков. М.: ГЕОС. 108 с.]
- Ogg J., Pillans B. 2008. Establishing quaternary as a formal international period / System. *Episodes*. 31(2): 230–233. doi:10.18814/epiiugs/2008/v31i2/008
- Pavliutkin B.I., Petrenko T.I. 2010. *Stratigraphy of Paleogene-Neogene deposits of the Primorye*. Vladivostok: Dalnauka Press. 164 p. [Павлюткин Б.И., Петренко Т.И. 2010. *Стратиграфия палеоген-неогеновых отложений Приморья*. Владивосток: Дальнаука. 164 с.]
- Pillans B., Gibbard P. 2012. In: *The geological time scale*. Amsterdam: Elsevier. Pp. 979–1010. doi: 10.1127/0078-0421/2012/0020

- Pushkar V.S., Likhacheva O.Yu., Usoltseva M.V. 2019. Zonal Diatom Scale of the Continental Neogene in Primorye (Most Southern Territory of the Russian Far East). *Int. J. Algae*. 22(3): 163–176. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v21.i2.60>
- Svitoch A.A. 2016. Position of lower boundaries of the international stratigraphic scale stages of upper Pliocene and Quaternary in succession of Great Caspian Sea and paleogeographical events. *Bull. Mosc. Soc. Nat.* 91(2–3): 63–73. [Свиточ А.А. 2016. Положение в разрезах Большого Каспия нижних границ ярусов верхнего плиоцена и квартера Международной стратиграфической шкалы и палеогеографические события. *Бюл. Моск. общ-ва испыт. природы*. 91(2–3): 63–73].
- Wang Pinxian, Zhao Quanhong, Jian Zhimin, Cheng Xinrong, Huang Wei, Tian Jun, Wang Jiliang, Li Qianyu, Li Baohua, Su Xin. 2003. Thirty million year deep-sea records in the South China Sea. *Chin. Sci. Bull.* 48(23): 2524–2535.

Підписала до друку О.П. Ольштинська

Pushkar V.S. 2021. **Upper pliocene diatom complexes and its significance to establish lower boundary of quarter (South of the Far East)**. *Algologia*. 31(2): 141–149

Far East Geological Institute of the Far East Branch of the Russian Academy of Science, 159 100-Letiya Ave., Vladivostok 690022, Russia

An analysis of the evolutionary distribution of diatoms in the outcrops of the Late Cenozoic shows that, upon reaching the level of the Annensky Horizon (Gelazian stage), the extinct species disappear almost completely. A predominance of the alluvial type of sedimentogenesis and reduction in the lake basins areas are clearly registered for deposits of the diatom zone *Aulacoseira praegranulata* var. *praeislandica* f. *praeislandica*. A cooling in the Late Pliocene with the pronounced temperature minimum at the level about 2,58 million years is fairly bright reflected in the ecological structures of diatomic associations (upper complex): the benthic arcto- and north-boreal flora predominates. Of that time, a total absence of the pollen of the broad-leaved species is also characteristic and paleo-landscapes become close to the Eopleistocene ones. From this moment on, the coexistence and expansion of the polar ice sheets begin (transition of planet from the “Green house” mode to the “Ice house” mode) which determine the formation of the modern climatic system of the Earth which emphasizes the globality of the palaeoclimatic event. From the lithological point of view, the bottom of the red rocks strata of the Annensky Horizon corresponding to the Gelazian stage bottom (2,58 million years) coincides with this boundary in the southern Primorye. The age changes of the Quarter boundary to this chronostratigraphic level is well founded.

Key words: Quarter, Pliocene, Gelazian stage, Shufansky horizon, paleoclimate, Primorye

**Неприкріплена форма цистозіри в Чорному морі: таксономія
Gongolaria barbata f. *repens* comb. nov.**

Садогурська С.С.

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, Київ 01601, Україна
s.sadogurska@gmail.com

Надійшла до редакції 20.04.2021. Після доопрацювання 12.05. 2021. Підписана до друку 21.05.2021.
Опублікована 29.06.2021

Реферат. Бурі водорості з роду *Cystoseira* sensu lato є ключовими ценозоутворюючими видами у басейні Середземного моря, до якого також належать Чорне та Азовське моря. Окрім типових прикріплених форм цистозір (*Ericaria crinita* f. *bosphorica* (Sauvageau) S.S.Sadogurska, J.Neiva et A.Israel та *Gongolaria barbata* (Stackhouse) Kuntze) для Чорного моря була описана також неприкріплена форма, таксономічний статус якої залишався невизначеним. За результатами порівняльно-морфологічного аналізу показано, що чорноморські зразки неприкріпленої цистозіри відносяться до виду *G. barbata*. Водночас, зразки неприкріпленої цистозіри, відібрані у Джарилгацькій затоці у заростях морської трави *Zostera marina* L., мають чіткі морфологічні відмінності. Таломі 30–50 см завдовжки світло-коричневого або жовто-коричневого кольору, підошва відсутня, головний стовбур редукований або, якщо наявний, дуже короткий та тонкий (2–4 мм). Бічні гілки тонкі (2–3 мм), гладенькі, відходять хаотично, 15–30 см завдовжки. Кінцеві гілочки ниткоподібні, з великою кількістю овальних повітряних пухирів, розташованих у вигляді чоток. Рецептакули наявні лише у деяких таломів, веретеновидні, 8–12 мм завдовжки, без шипиків, але зі стерильним відростком на кінці. На основі цих параметрів запропонована нова номенклатурна комбінація – *Gongolaria barbata* f. *repens* (A.D.Zinova & Kalugina) S.S. Sadogurska comb. nov. Показано, що номенклатурна комбінація *Cystoseira concatenata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina є невалідною. Встановлено, що неприкріплена форма *G. barbata* f. *repens* не є синонімічною до виду *Cystoseira aurantia* Kützinger sensu Orellana et al. (2019), який раніше був віднесений до роду *Cystoseira* s. s. Аналіз філогенетичних дерев інших авторів засвідчив, що зразки неприкріплених цистозір із Середземного моря не потрапляють до клади *G. barbata* та, ймовірно, є неприкріпленими формами інших видів.

Ключові слова: Чорне море, бурі водорості, номенклатура, таксономія, *Cystoseira* sensu lato, *Gongolaria barbata* f. *repens*

© Садогурська, 2021

Вступ

Бурі водорості роду *Cystoseira* s. l. є ключовими ценозоутворюючими видами в басейні Середземного моря, до якого також належать Чорне та Азовське моря (Kalugina-Gutnik, 1975; Fabbrizzi et al., 2020; Sadogurskiy et al., 2020). Цей рід формує основу морських донних екосистем. Проте в останні роки цистозірові зарості значно скоротилися, а подекуди взагалі зникли внаслідок трансформації або знищення прибережно-морських біотопів, забруднення довкілля та зміни клімату (Tkachenko, 2004; Thibaut et al., 2015). Така ситуація спостерігається в усьому Середземноморському регіоні, тому майже всі види цистозір сьогодні перебувають під охороною (Sadogurska, 2017).

Вже декілька десятиліть увага вчених сфокусована на вивченні угруповань та оселищ *Cystoseira* s. l. в Атлантично-Середземноморському регіоні (Fabbrizzi et al., 2020). При цьому останні дослідження засвідчили поліфілетичність атлантично-середземноморських цистозір (Draisma et al., 2010; Bruno de Sousa et al., 2019). Пізніше за результатами молекулярно-філогенетичного аналізу, а також на основі морфологічних та анатомічних ознак рід *Cystoseira* s. l. був розділений на три окремі роди: *Cystoseira sensu stricto*, *Gongolaria* Boehmer і *Ericaria* Stackhouse із утворенням нових номенклатурних комбінацій для багатьох видів (Orellana et al., 2019; Molinari, Guiry, 2020).

За результатами порівняльно-морфологічного та молекулярно-філогенетичного вивчення для Чорного моря було показано, що водорості з роду *Cystoseira* s. l. представлені видами, які філогенетично належать до родів *Ericaria* та *Gongolaria* (Sadogurska et al., 2021): *Ericaria crinita* f. *bosphorica* (Sauvageau) S.S.Sadogurska, J.Neiva et A.Israel та *Gongolaria barbata* (Stackhouse) Kuntze.

Водночас для північної частини Чорного моря відомий ще один таксон – *Cystoseira barbata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina. Ця форма була описана О.А. Калугіною-Гутник та А.Д. Зіною з акваторії Казачої бухти (Кримський п-ів) (Zinova, Kalugina, 1974). За літературними даними, окрім бухти Казачої (Mironova et al., 2012), у північній частині Чорного моря таксон також відмічений у Джарилгацькій та Геленджицькій затоках (Zinova, Kalugina, 1974), морській частині оз. Донузлав (Milchakova, Aleksandrov, 1999) та Таманській затоці (Report..., 2008). Однак досі статус цього таксону залишається невизначеним. У зв'язку із цим, метою даної роботи було визначення таксономічного статусу чорноморської неприкріпленої цистозіри *Cystoseira barbata* f. *repens* на основі порівняльно-морфологічного аналізу та номенклатурної ревізії.

Матеріали та методи

Матеріалом для порівняльно-морфологічних досліджень були оригінальні збори зразків прикріпленої *Gongolaria barbata* та не-прикріпленої *Cystoseira barbata* f. *repens* з акваторії Чорного моря. Зразки *G. barbata* відбирали біля відкритих прибійних берегів, безпосередньо із фітоценозів цистозір, із зони субліторалі (на глибині 1,5–3,0 м) в 11 пунктах упродовж 2016–2020 рр. (рис. 1).

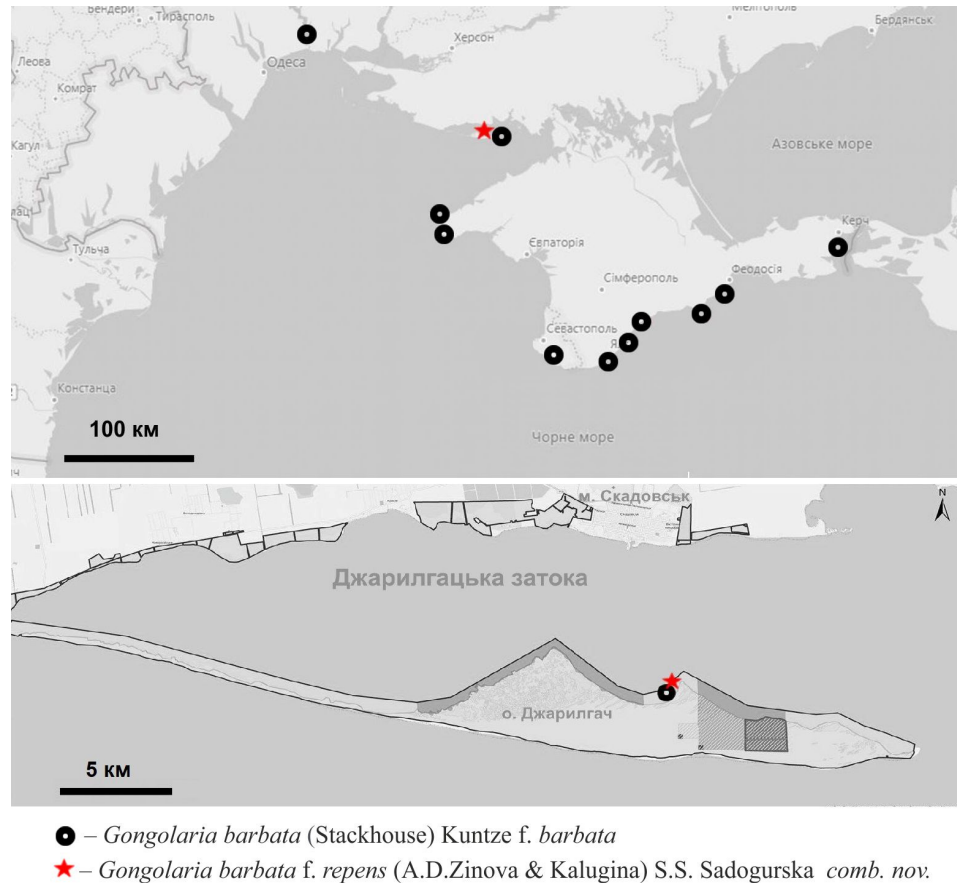


Рис. 1. Карта-схема районів дослідження та місця відбору проб (зроблено із використанням сервісу <https://www.bing.com/maps> та карти функціонального зонування Джарилгацького НПП, <http://nppd.com.ua/map>)

Зразки *Cystoseira barbata* f. *repens* відібрані в районі коси Глибокої (північна частина о. Джарилгач), у межах Джарилгацького національного природного парку на глибині 2–3 м у заростях морської трави *Zostera marina* L. під час експедиції в серпні 2020 р. Проби відбирали за загальноприйнятою гідроботанічною методикою під час самостійних

занурень з використанням легководолазного спорядження (Kalugina, 1969). Відібрані зразки цистозір визначали за морфологічними ознаками, як вказано в роботах А.Д. Зінової та О.А. Калугіної-Гутник (Zinova, 1967; Zinova, Kalugina, 1974; Kalugina-Gutnik, 1975).

Сучасна номенклатура таксонів *Cystoseira* s. l. подана відповідно до Molinari, Guiry (2020) та онлайн ресурсу *AlgaeBase* (Guiry, Guiry, 2021). Підводні та макрофотографії зроблені за допомогою цифрової фотокамери Fujifilm X10. Частина зразків зберігається у вигляді гербарних зразків, виготовлених за методиками, загальноприйнятими для макроводоростей. Основні гербарні збори зберігаються в гербарії макроводоростей альготеки Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (KW-A).

Результати

Зразки з Чорного моря, які були морфологічно ідентифіковані як прикріплена *Gongolaria barbata* (= *Cystoseira barbata*), відповідали діагнозу виду та описам, наданим у різних ідентифікаційних ключах (Zinova, 1967; Zinova, Kalugina, 1974; Kalugina-Gutnik, 1975; Gomez Garreta et al., 2000; Cormaci et al., 2012).

Талом висотою 20–170 см прикріплюється до субстрату великою підошвою у формі диску, 5–10 мм в діаметрі (рис. 2, А, Б). Колір талому темно-бурий, майже чорний. Стовбур циліндричний, біля основи товщиною 5–15 мм, висотою 10–30 см, зазвичай густо вкритий епіфітами. Апекс основного стовбура дуже помітний, гладенький (рис. 2, В). Від стовбура відходять бічні гілки двох типів: первинні, або головні, та вторинні, або адвентивні, які густо вкривають поверхню стовбура. Перші мають довжину 100–400 мм, другі 50–100 мм. Основа бічних гілок I порядку у *G. barbata* досить товста, тому гілки, як правило, відламуються на деякій відстані від стовбура. На пеньках, що утворилися, активніше формуються адвентивні гілки, які густо вкривають поверхню стовбура від самого низу. Вторинні гілочки розгалужені, циліндричні, коротші за основні. Шиповидні придатки та колючки відсутні на всіх частинах талому, що є характерною ознакою виду. Повітряні пухирі численні, довгасто-овальні, довжиною 7–15 мм та шириною 2–5 мм (довжина зазвичай у 2–3 рази більша за ширину), розвиваються на бічних гілочках, особливо рясно поблизу рецептакулів; розташовуються поодинокі або чотковидно, по 2–10, на гілках I–V порядків (рис. 2, Г). Рецептакули розташовуються на кінцях гілочок, по одному, мають довжину 2–20 мм і ширину 1–3 мм, овальні, веретеновидні або серповидні, без шипиків, з гладкою, трохи горбистою поверхнею та на вершині зі стерильним відростком (мукроном) (рис. 2, Г). Зразки характеризуються великим діапазоном морфологічної мінливості, що залежить від сезону та впливу хвиль (Sadogurska et al., 2021). Зокрема, розмір талому, довжина стовбурів,

форма та розмір рецептакулів і повітряних пухирів мають найбільшу пластичність. Аналіз анатомічної будови *G. barbata* показав, що медула складається з дрібних клітин округлої форми. Кора сформована більшими клітинами, що мають досить товсті стінки. Збільшення товщини стовбура відбувається за рахунок розростання проміжного шару, який розсуває тканини сусідніх шарів. Меристодерма представлена одним рядом асиміляційних клітин квадратної форми. Ці характеристики узгоджуються з описом роду *Gongolaria* (= *Treptacantha* sensu Orellana et al.) (Orellana et al., 2019; Molinari, Guiry, 2020).

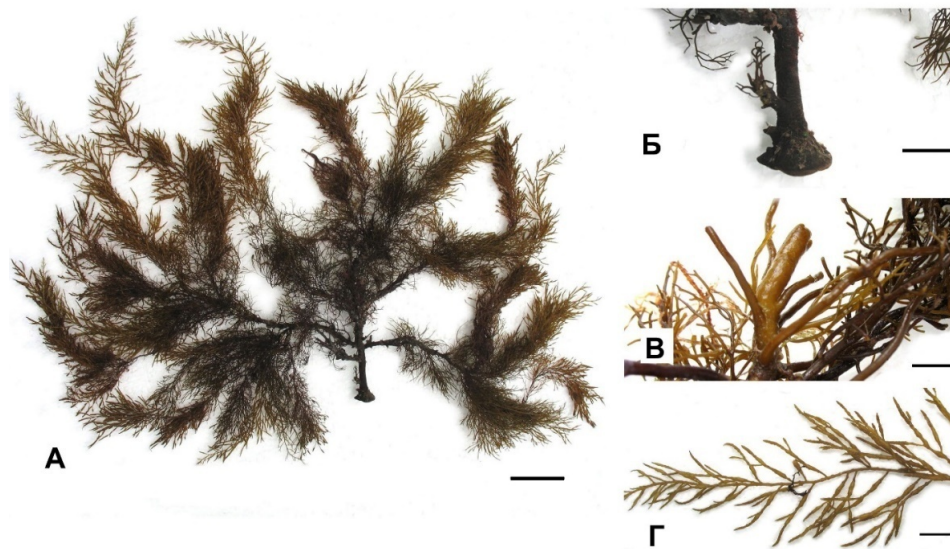


Рис. 2. Зовнішній вигляд типової *Gongolaria barbata* з Чорного моря (ваучер зразка BN1, відібраний в акваторії біля м. Март'яна) за Sadogurska et al. (2021): А – загальний вигляд талому; Б – підосва у формі диска; В – апекс стовбура; Г – кінцева гілочка з повітряними пухирями та рецептакулами. Масштаб: 3 см (А), 1 см (Б, В, Г)

Зразки неприкріпленої цистозіри, відібрані у Джарилгацькій затоці у заростях морської трави *Zostera marina* L., мають морфологічні відмінності та відповідають опису таксону *Cystoseira barbata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina (Zinova, Kalugina, 1974) (рис. 3, В, Г). Таломи 30–50 см завд., світло-коричневого або жовто-коричневого кольору. У неприкріпленої форми відсутня підосва, головний стовбур редукований або, якщо наявний, дуже короткий та тонкий (2–4 мм) (рис. 3, А). Бічні гілки тонкі (2–3 мм), гладенькі, відходять хаотично, 15–30 см завдовжки. Кінцеві гілочки ниткоподібні, з великою кількістю овальних повітряних пухирів, розташованих у вигляді чоток (по 3–6 пухирів). Рецептакули наявні лише у деяких таломів, веретеновидні, 8–12 мм завдовжки, без шипиків, але зі

стерильним відростком на кінці (рис. 3, Б). У *Cystoseira barbata* f. *repens*, на відміну від прикріплених форм, стінки клітин значно тонші, а самі клітини крупніші.

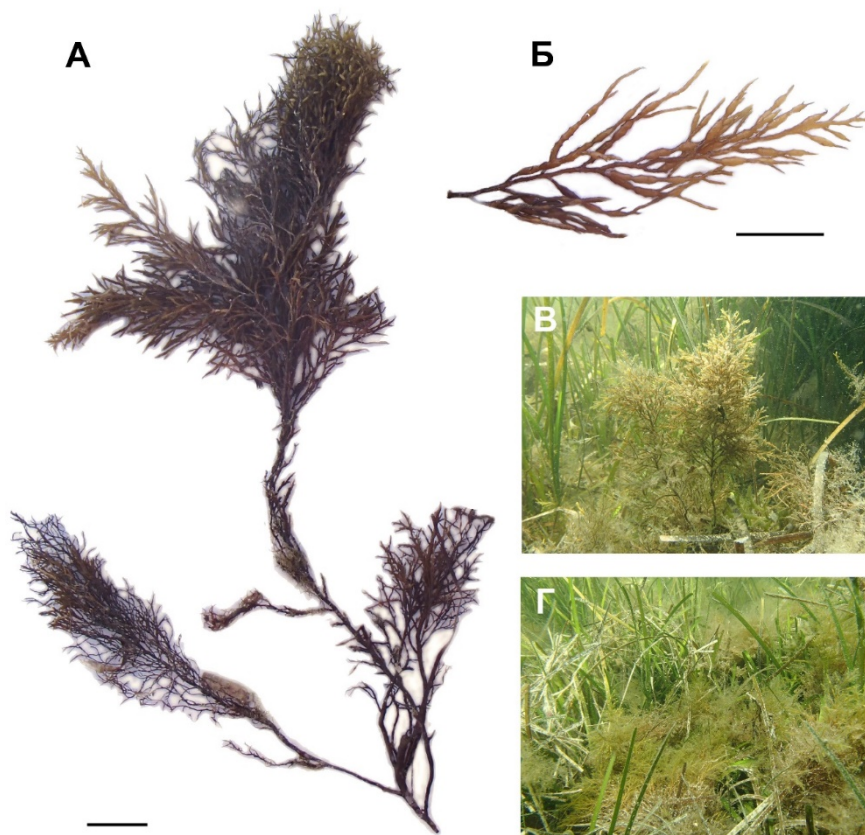


Рис. 3. Неприкріплена *Gongolaria barbata* f. *repens* з Чорного моря (зразок відібраний в акваторії Джарилгацької бухти). А – загальний вигляд талому; Б – кінцева гілочка з повітряними пухирями та рецептакулами; В – загальний вигляд талому *in situ*; Г – *G. barbata* f. *repens* у заростях морської трави *Zostera marina* L. Масштаб 1 см

Обговорення

Неприкріплена форма *Cystoseira barbata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina має низку унікальних морфологічних характеристик. Ця форма була описана О.А. Калугіною-Гутник та А.Д. Зіноюю (1974) з акваторії Казачої бухти (Кримський п-ів): “*Typus. URSS, Tauria, sinus Kasaczja dictus, 3m alt., X 1970, A.A. Kalugina; in Inst. Bot. Acad. sci. URSS (Leningrad) conservatur*”.

Пізніше, у 1985 р., Дж. Джакконе описав неприкріплені цистозіри зі Середземного моря як *Cystoseira barbata* f. *aurantia* (Kützting) Giaccone (Amico et al., 1985), ґрунтуючись на описі таксону *Cystoseira aurantia* Kützting, що був запропонований Ф.Т. Кютцингом (Kützting, 1843):

“*Cystosira aurantia*.

C. ramis maxime elongatis, inermibus; foliis dichotomis, setaceis; aerocystis diaphanis, elliptico-oblongis, aurantiacis, longo concatenatis, sursum sensim minoribus; carpomatibus ovato-lanceolatis, rare elongatis, solitariis, simplicibus, apice longe cuspidatis.

Golf von Triest, 1835.”

Хоча номенклатурна комбінація *Cystoseira barbata* f. *repens* була запропонована на 10 років раніше, надалі для означення неприкріплених цистозір у Середземному морі європейські дослідники традиційно використовували саме номенклатурну комбінацію *Cystoseira barbata* f. *aurantia*, що можна пояснити певною ізоляцією радянської науки та відсутністю доступу наукової спільноти до російськомовних публікацій. Пізніше Ribera et al. (1992) та Gómez-Garreta et al. (2001) запропонували вважати *Cystoseira barbata* f. *aurantia* та *C. aurantia* синонімом *C. barbata* f. *repens* і використовувати саме останню комбінацію для характеристики неприкріплених середземноморських цистозір. Проте ця думка не стала загальноприйнятою і автори в наступному чек-листі (Cormaci et al., 2012) вказують, що пріоритет повинна мати номенклатурна комбінація *Cystoseira barbata* f. *aurantia*.

Ще більшої плутанини додали результати молекулярно-філогенетичних досліджень, в які потрапили зразки неприкріплених цистозір. У роботі Bruno de Sousa et al. (2019) проаналізовано зразок неприкріпленої цистозіри, визначений авторами як *Cystoseira barbata* f. *aurantia* (ваучер зразку MBR87). Зразок було відібрано на атлантичному узбережжі Іспанії (окол. м. Кадіс); отримані авторами нуклеотидні послідовності задепоновані в базі GenBank (MF767972, MF768074, MF768028). Аналіз філогенетичних дерев, наведених у роботі Bruno de Sousa et al. (2019), свідчить про те, що сіквенс цього зразка формують кладу разом із послідовностями атлантичних зразків *Gongolaria nodicaulis* (Withering) Molinari & Guiry.

В іншій роботі з філогенії цистозір (Orellana et al., 2019) автори також включили до аналізу зразок неприкріпленої цистозіри (відібраний на о. Тенеріфе, Атлантичний океан), якій ними на основі морфологічних ознак був визначений як *Cystoseira barbata* f. *aurantia* (ваучер зразку TFC:15276; сіквенс у GenBank – MH513833, MH513840, MH513848, MH513859). Водночас молекулярно-філогенетичний аналіз показав, що зразок належить не до роду *Gongolaria* (куди був віднесений вид *G. barbata*), а до роду *Cystoseira* s. s. Далі, на основі цього результату, автори (Orellana et al., 2019) роблять, на наш погляд, декілька помилкових висновків. Зокрема, вони зазначають, що факт того, що зразок неприкріпленої цистозіри, визначений як *Cystoseira barbata* f. *aurantia* (= *Cystoseira aurantia*), потрапив у кладу *Cystoseira* s. s. і є генетично віддаленим від

Gongolaria barbata, дозволяє відновити видовий ранг для таксону *Cystoseira aurantia* Kützting та віднести всі неприкріплені цистозіри до роду *Cystoseira* s.s.

При цьому, автори не аналізували ані типового зразка, ані морфологічних характеристик *Cystoseira aurantia*, ані того факту, що нуклеотидні послідовності їхнього зразка ідентичні послідовностям *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff & Nizamuddin, що були відібрані в тому самому пункті (Orellana et al., 2019). Більш того, автори вказують *Cystoseira concatenata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina як один із синонімів *Cystoseira aurantia*, що викликає багато додаткових запитань.

Як результат, наразі інтернет-ресурс *AlgaeBase* вказує наступну синонімію таксонів: *Cystoseira concatenata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina = *Cystoseira barbata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina = *Cystoseira barbata* f. *aurantia* (Kützting) Giaccone = *Cystoseira aurantia* Kützting (Guiry, Guiry, 2021).

По-перше, хоча номенклатурна комбінація *Cystoseira concatenata* f. *repens* і трапляється в декількох сучасних джерелах (Minicheva et al., 2014; Guiry, Guiry, 2021), А.Д. Зінова та О.А. Калугіна-Гутнік ніколи не пропонували такої назви (Zinova, Kalugina, 1974). Тому ця комбінація повинна розглядатися як *nom. inval.* По-друге, якщо автори й мали на увазі номенклатурну комбінацію *Cystoseira barbata* f. *repens*, то вона аж ніяк не може бути синонімом *Cystoseira aurantia* sensu Orellana et al. (2019), що віднесена авторами до роду *Cystoseira* s.s., оскільки *C. barbata* є представником роду *Gongolaria* (Sadogurska et al., 2021).

Як зазначалося вище, А.Д. Зінова та О.А. Калугіна-Гутнік описали неприкріплену форму на основі чорноморського матеріалу і, базуючись на морфологічних ознаках, віднесли її до виду *Cystoseira barbata* (як *C. barbata* f. *repens*). Типовий зразок цього таксону було відібрано біля узбережжя Кримського п-ова (Zinova, Kalugina, 1974; Mikhaylova, Sokolova, 2020), а результати наших молекулярних досліджень показують наявність у північній частині Чорного моря лише двох таксонів, що належать до родів *Ericaria* та *Gongolaria*. Зразки прикріплених цистозірів із Джарилгацької бухти на основі молекулярно-філогенетичного аналізу віднесені нами до виду *Gongolaria barbata* (Sadogurska et al., 2021).

Крім того, результати порівняльно-морфологічного аналізу зразків неприкріпленої цистозіри з Джарилгацької бухти (Чорне море) підтверджують їхню приналежність до виду *G. barbata* (анатомічна будова, відсутність шипиків на таломі, чотковидні повітряні пухирі, веретеновидні рецептакули з мукроном).

Саме тому вважаємо за доцільне запропонувати для чорноморських зразків неприкріпленої цистозіри нову номенклатурну комбінацію:

Gongolaria barbata* f. *repens (A.D.Zinova & Kalugina) S.S.Sadogurska comb. nov.

Базіонім: *Cystoseira barbata* f. *repens* A.D.Zinova & Kalugina (1974: 121, fig. 3). Published in: Zinova A.D. & Kalugina A.A. (1974). On the systematic of the genus *Cystoseira* Ag. in the Black Sea [In Russian: К систематике видов рода *Cystoseira* Ag. в Чёрном море]. *Novosti Sistematiki Nizshikh Rastenij*, 11: 116–125.

Holotype: Ukraine, the Black Sea, Kazacha Bay, Crimean Peninsula, October 1970, collected by A.A. Kalugina, Herbarium specimen A0000250 (Algal herbarium of the Komarov Botanical Institute, Saint Petersburg, Russia, – LE) (Mikhaylova, Sokolova, 2020).

Diagnosis: Thalli are unattached, prostrate, floating, 30–80 cm long, light brown or yellow-brown. Holdfast is absent; the primary axis is reduced or, if present, very short and thin (1–4 mm). Thalli are characterized by the absence of spines, tophules, and iridescence. Lateral branches are thin (2–3 mm), smooth, rare; 15–30 cm long. Ultimate branches are thin and filamentous, sometimes with oval-shaped aerocysts, single or arranged in chains. Receptacles are rarely present, spindle-shaped, 8–12 mm in length, without spines, but with a sterile mucron at the end. Typically, among seagrass meadows at 0.5–3 m depth, in large gulfs and bays.

Заключення

Отже, за результатами порівняльно-морфологічного аналізу, для неприкріпленої форми *Gongolaria barbata* запропоновано нову номенклатурну комбінацію – *Gongolaria barbata* f. *repens* (A.D.Zinova & Kalugina) S.S.Sadogurska comb. nov. Спростовано уявлення про синонімічність останнього таксону до виду *Cystoseira aurantia* Kützinger sensu Orellana et al. (2019), для якого, на наш погляд, видовий ранг був повернутий необґрунтовано.

Таким чином, показано, що в північній частині Чорного моря трапляються три таксони цистозір: *Ericaria crinita* f. *bosporica* (Sauvageau) S.S.Sadogurska, J.Neiva et A.Israel, *Gongolaria barbata* (Stackhouse) Kuntze f. *barbata* та *Gongolaria barbata* f. *repens* (A.D.Zinova & Kalugina) S.S.Sadogurska comb. nov.

Щодо середземноморських та атлантичних зразків то, на нашу думку, ми маємо справу з крайніми проявами морфологічної пластичності цистозір. Аналіз робіт інших дослідників свідчить про те, що неприкріплені форми, ймовірно, можуть утворюватися не лише у *Gongolaria barbata*. Так, у випадку зі зразком, про який йдеться в роботі Bruno de Sousa et al. (2019), можливо, представлено неприкріплену форму *Gongolaria nodicaulis*. А зразок, помилково описаний як *Cystoseira aurantia*, може бути неприкріпленою формою *Cystoseira compressa*. Додатковим

аргументом є той факт, що обидва зразки були відібрані в Атлантичному океані, а *Gongolaria barbata*, на думку багатьох дослідників, є середземноморським видом і в Атлантиці не трапляється (Berov et al., 2015). Зазначене, по-перше, ще раз підкреслює необхідність молекулярно-філогенетичного аналізу для визначення цистозіри, а по-друге – є прикладом того, що одних лише молекулярних даних недостатньо для коректного визначення видів водоростей. Таксономія та поширення середземноморських та атлантичних неприкріплених цистозіри потребує уточнення та подальших досліджень із залученням молекулярно-філогенетичних методів.

Список літератури

- Amico V., Giaccone G., Colombo P., Colonna P., Mannino A.M., Randazzo R. 1985. Un nuovo approccio allo studio della sistematica del genere *Cystoseira* C.Agardh (*Phaeophyta*, *Fucales*). *Boll. Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania*. 18: 887–986.
- Berov D., Ballesteros E., Sales M., Verlaque M. 2015. Reinstatement of species rank for *Cystoseira bosphorica* Sauvageau (*Sargassaceae*, *Phaeophyceae*). *Cryptogamie. Algologie*. 36(1): 65–80.
- Bruno de Sousa C., Cox C. J., Brito L., Pavão M.M., Pereira H., Ferreira A., Ginja C., Campino L., Bermejo R., Parente M., Varela J. 2019. Improved phylogeny of brown algae *Cystoseira* (*Fucales*) from the Atlantic-Mediterranean region based on mitochondrial sequences. *PLOS ONE*. 14(1): Article e0210143.
- Cormaci M., Furnari G., Catra M., Alongi G., Giaccone G. 2012. Flora marina bentonica del Mediterraneo: *Phaeophyceae*. *Boll. Accad. Gioenia Sci. Nat. Catania*. 45(375): 1–508.
- Draisma S.G., Ballesteros E., Rousseau F., Thibaut T. 2010. DNA sequence data demonstrate the polyphyly of the genus *Cystoseira* and other *Sargassaceae* genera (*Phaeophyceae*). *J. Phycol.* 46: 1329–1345.
- Fabbrizzi E., Scardi M., Ballesteros E., Benedetti-Cecchi L., Cebrian E., Ceccherelli G., De Leo F., Deidun A., Guarnieri G., Falace A., Fraissinet S., Giommi C., Mačić V., Mangialajo L., Mannino A.M., Piazzini L., Ramdani M., Rilov G., Rindi L., Rizzo L., Sarà G., Souissi J.B., Taskin E., Fraschetti S. 2020. Modeling Macroalgal Forest Distribution at Mediterranean Scale: Present Status, Drivers of Changes and Insights for Conservation and Management. *Front. Mar. Sci.* 7: 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00020>
- Gómez-Garreta A., Barceló M.C., Gallardo T., Pérez-Ruzafa I., Ribera M.A., Rull J. 2001. *Flora Phycologica Iberica Vol. 1. Fucales*. Murcia: Universidad de Murcia. 166 p.
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2021. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Available at: <https://www.algaebase.org>. (Accessed 01 March 2021).
- Kalugina A.A. 1969. Study of the bottom vegetation of the Black Sea with the use of light diving equipment. In: *Marine underwater research*. Moscow: Nauka. Pp. 105–113. [Калугина А.А. 1969. Исследование донной растительности Чёрного моря с применением легководолазной техники. В кн.: *Морские подводные исследования*. М.: Наука. Pp. 105–113].

- Kalugina-Gutnik A.A. 1975. *Phytobenthos of the Black Sea*. Kyiv: Naukova Dumka. 248 p. [Калугина-Гутник А.А. 1975. *Фитобентос Чёрного моря*. Киев: Наук. думка. 248 с.].
- Kützing F.T. 1843. *Phycologia generalis oder Anatomie, Physiologie und Systemkunde der Tange. Mit 80 farbig gedruckten Tafeln, gezeichnet und gravirt vom Verfasser*. Leipzig: F.A. Brockhaus.
- Milchakova N.A., Aleksandrov V.V. 1999. Bottom vegetation of some areas of the Donuzlav estuary (Black Sea). *Ekol. Mor.* 49: 68–71. [Мильчакова Н.А., Александров В.В. 1999. Донная растительность некоторых районов лимана Донузлав (Черное море). *Экол. моря*. 49: 68–71].
- Mikhaylova T.A., Sokolova I.V. 2020. Type and authentic specimens in algal herbarium of the Komarov Botanical Institute (LE). II. *Bot. J.* 105(11): 1114–1126.
- Minicheva G., Afanasyev D., Kurakin A. 2014. *Black Sea monitoring guidelines: Macrophytobenthos*. Istanbul: Secretariat of commission on protection of the Black Sea against pollution.
- Mironova N.V., Milchakova N.A., Aleksandrov V.V. 2012. Trends in long-term changes in macrophyte reserves in Kazachya Bay (Sevastopol, Crimea, Black Sea). *Mor. Ekol. J.* 11(3): 68–78. [Миронова Н.В., Мильчакова Н.А., Александров В.В. 2012. Тенденции долговременного изменения запасов макрофитов в бухте Казачья (Севастополь, Крым, Чёрное море). *Мор. экол. журн.* 11(3): 68–78].
- Molinari E.A., Guiry M.D. 2020. Reinstatement of the genera *Gongolaria* Boehmer and *Ericaria* Stackhouse (*Sargassaceae*, *Phaeophyceae*). *Notulae Algarum*. 171: 1–10.
- Orellana S., Hernández M., Sansón M. 2019. Diversity of *Cystoseira* sensu lato (*Fucales*, *Phaeophyceae*) in the eastern Atlantic and Mediterranean based on morphological and DNA evidence, including *Carpodesmia* gen. emend. and *Treptacantha* gen. emend. *Europ. J. Phycol.* 54(3): 447–465.
- Report on the preliminary results of the expedition of the Institute of Oceanology. P.P. Shirshov RAS and the World Wildlife Fund (WWF) to the Kerch Strait region to study the environmental consequences of the fuel oil spill after the Volgoneft-139 tanker accident on November 11, 2007. Ed. V.A. Spiridonov. Moscow: IO RAS Expedition – WWF, 2008. 67 p. [Отчет о предварительных результатах экспедиции Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН и Всемирного фонда дикой природы (WWF) в район Керченского пролива для изучения экологических последствий разлива мазута после аварии танкера «Волgoneфть-139» 11 ноября 2007 г. Под ред. В.А. Спиридонова. М.: Экспедиция ИО РАН – WWF, 2008. 67 с.].
- Ribera M.A., Gómez-Garreta A., Gallardo T., Cormaci M., Furnari G., Giaccone G. 1992. Check-list of Mediterranean seaweeds. I. *Fucophyceae* (Warming 1884). *Bot. Mar.* 35: 109–130.
- Sadogurska S.S. 2017. Prospects for the protection of cystosea groups in the framework of the creation of protected marine objects Natura 2000 and the Emerald Network of Ukraine. In: *NATURA 2000 network as an innovative system of protection of rare species and habitats in Ukraine: «Conservation Biology in Ukraine»*. Issue 1. Kyiv. Pp. 204–207. [Садогурська С.С. 2017. Перспективи охорони цистозірових угруповань в рамках створення природо-

- охоронних морських об'єктів Натура 2000 та Смарагдової мережі України. В кн.: *Мережа NATURA 2000 як інноваційна система охорони рідкісних видів та оселищ в Україні. Серія: «Conservation Biology in Ukraine»*. Вип. 1. Київ. С. 204–207].
- Sadogurskiy S.Yu., Sadogurska S.S., Belich T.V., Sadogurskaya S.A. 2020. Distribution of *Cystoseira* s.l. in the Sea of Azov. *Algologia*. 30(4): 359–381. [Садогурський С.Ю., Садогурська С.С., Беліч Т.В., Садогурська С.О. 2020. Поширення видів *Cystoseira* s. l. в Азовському морі. *Альгологія*. 30(4): 359–381]. <https://doi.org/10.15407/alg30.04.359>
- Sadogurska S.S., Neiva J., Falace A., Serrao E.A., Israel A. 2021. Taxonomic revision of the genus *Cystoseira* s.l. (*Ochrophyta*, *Fucales*, *Sargassaceae*) in the Black Sea: morphological variability and molecular taxonomy of *Gongolaria barbata* and *Ericaria crinita* f. *bosporica* comb. nov. *Phytotaxa*. 480(1): 1–21. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.480.1.1>
- Sadogurskiy S.Yu., Sadogurska S.S., Belich T.V., Sadogurskaya S.A. 2020. Distribution of *Cystoseira* s.l. in the Sea of Azov. *Algologia*. 30(4): 359–381. [Садогурський С.Ю., Садогурська С.С., Беліч Т.В., Садогурська С.О. 2020. Поширення видів *Cystoseira* s. l. в Азовському морі. *Альгологія*. 30(4): 359–381]. <https://doi.org/10.15407/alg30.04.359>
- Thibaut T., Blanfuné A., Boudouresque C.-F., Verlaque M. 2015. Decline and local extinction of *Fucales* in the French Riviera: the harbinger of future extinctions? *Mediterr. Mar. Sci.* 16(1): 206–224.
- Tkachenko F.P. 2004. Species composition of macrophyte algae in the northwestern part of the Black Sea. *Algologia*. 14(3): 277–293. [Ткаченко Ф.П. 2004. Видовой состав водорослей-макрофитов северо-западной части Черного моря. *Альгология*. 14(3): 277–293].
- Zinova A.D. 1967. *Key to green, brown and red algae of the Southern seas of the USSR*, Moscow, Leningrad: Nauka. 400 p. [Зинова А.Д. 1967. *Определитель зеленых, бурых и красных водорослей Южных морей СССР*. М., Л.: Наука. 400 с.].
- Zinova A.D., Kalugina A.A. 1974. The taxonomy of species of the genus *Cystoseira* Ag. in the Black Sea. *Novosti Sistem. Nizshikh Rast.* 11: 116–125. [Зинова А.Д., Калугина А.А. 1974. К систематике видов рода *Cystoseira* Ag. в Чёрном море. *Новости системат. низших раст.* 11: 116–125].

Підписала до друку Г.Г. Мінічева

Sadogurska S.S. 2021. **Unattached *Cystoseira* s. l. in the Black Sea: taxonomy of *Gongolaria barbata* f. *repens* comb. nov.** *Algologia*. 31(2): 150–162

M.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,
2 Tereshchenkivska Str., Kyiv 01601, Ukraine

Brown algae of the genus *Cystoseira* s. l. are key species in the Mediterranean basin, including the Black Sea and the Sea of Azov. In addition to the typical attached forms of *Cystoseira sensu lato* (*Ericaria crinita* f. *bosporica* (Sauvageau) S.S.Sadogurska, J.Neiva et A.Israel, and *Gongolaria*

barbata (Stackhouse) Kuntze), an unattached form was previously described for the Black Sea. The taxonomic status of this taxon remained uncertain. According to the results of a comparative morphological analysis, it is shown that the Black Sea unattached samples belong to the species *Gongolaria barbata*. But unattached thalli, collected in the Dzharylhach Bay in the seagrass meadows of *Zostera marina* L., have morphological differences. Thalli are 30–50 cm long, light brown or yellow-brown; the holdfast is absent, the main axis is reduced or, if present, very short and thin (2–4 mm). Lateral branches are thin (2–3 mm), smooth; their length is 15–30 cm. The ultimate branches are filamentous, sometimes with oval-shaped aerocysts, single or arranged in chains. Receptacles are rarely present, spindle-shaped, 8–12 mm in length, without spines, but with a sterile mucron at the end. Therefore, a new nomenclature combination is proposed: *Gongolaria barbata* f. *repens* (A.D. Zinova & Kalugina) S.S. Sadogurska comb. nov. It is shown that the nomenclature combination *Cystoseira concatenata* f. *repens* A.D. Zinova & Kalugina is invalid. In addition, it is shown that the unattached *Gongolaria barbata* f. *repens* is not synonymous with the species *Cystoseira aurantia* Kützinger sensu Orellana et al. (2019), which authors previously rearranged to the genus *Cystoseira* s.s. Analysis of phylogenetic trees from the works by different authors showed that unattached samples from the Mediterranean Sea and the Atlantic Ocean do not belong to the *Gongolaria barbata* clade and may be unattached forms of other species.

Key words: the Black Sea, brown algae, nomenclature, taxonomy, *Cystoseira* sensu lato, *Gongolaria barbata* f. *repens*

**Новий для флори України вид роду *Aulacoseira* Thw.
(*Bacillariophyta*)**

Генкал С.І.

Інститут біології внутрішніх вод ім. І.Д. Папаніна РАН,
сел. Борок, Некоузський р-н, Ярославська обл. 152742, Росія
genkal@ibiw.ru

Надійшла до редакції 11.11.2020. Після доопрацювання 26.11.2020. Підписана до друку 02.03.2021.
Опублікована 29.06.2021

Реферат. Вивчено негативи із зображенням стулок центричної діатомової водорості *Aulacoseira subborealis* (Nygaard) Denys, Muylaert et Krammer з Канівського водосховища та р. Десни, отримані за допомогою скануючої електронної мікроскопії. Досліджені кількісні (розмір колоній, діаметр стулки і висота її загину, відношення висоти загину стулки до її діаметру, число рядів ареол і ареол в 10 мкм на загині стулки, розмір кільцеподібної діафрагми) і якісні (короткі загострені шипи, розташування ареол на лицьовій частині стулки і її загині) морфологічні ознаки водорості відповідають діагнозу *A. pusilla* (F.Meister) A.Tuji & A.Houki, нового виду для флори України. У вивчених нами зразках мінімальні значення висоти загину стулки і відношення висота/діаметр мають дещо менші показники.

Ключові слова: водойми і водотоки України, новий для флори вид *Bacillariophyta*, *Aulacoseira subborealis*, *A. pusilla*, морфологія, скануюча електронна мікроскопія

Вступ

У 60–70 рр. XX ст. для водойм і водотоків України було відомо 12 прісноводних видів, різновидностей і форм водоростей роду *Melosira* C.Agardh (Algae..., 2007). У 1979 р. більшість його представників переведена до роду *Aulacoseira* Thw. (Simonsen, 1979). Наприкінці 90-х років у публікації, присвяченій *Bacillariophyta* України, було описано 12 їхніх видів і різновидностей (Bukhtiyarova..., 1999). До цього списку не увійшли *A. subarctica* (Scherbak et al., 1992) та *A. subborealis* (Maystrova et

© Генкал С.І., 2021

al., 2007), наведені для України. В останньому узагальненому зведенні з діатомових водоростей України вказується 14 видів і різновидностей роду *Aulacoseira* (Algae..., 2007).

В японському озері Сува був виявлений та описаний новий вид – *Melosira pusilla* F.Meister (Meister, 1913), який нещодавно переведено до роду *Aulacoseira* (*A. pusilla* (F.Meister) Tuji et Hoiki) (Tuji, Hoiki, 2004; Tuji, Williams, 2006). Цей вид характеризується короткими колоніями і низькопанцирними стулками (Meister, 1913; Tuji, Hoiki, 2004). Він відмічений також у водних екосистемах Європи і Америки (Houk et al., 2007; Potapova, 2010; Kiss et al., 2012; Houk et al., 2017; Peeters, Ector 2017).

Мета нашої роботи – повторне дослідження морфологічних особливостей центричної діатомової водорості *Alacoseira subborealis*.

Матеріали та методи

Матеріалом для дослідження слугували негативи із зображенням стулок, відібраних у Канівському вдсх. в 2003–2004 рр. і р. Десні (2004 р.), отриманих за допомогою скануючої електронної мікроскопії (Майстрова та ін., 2007).

Результати та обговорення

Раніше у фітопланктоні верхньої частини Канівського вдсх. та гирловій ділянці р. Десни був зафіксований новий для флори України представник роду *Aulacoseira* – *A. subborealis* (Nygaard) Lenys, Muylaert et Krammer (Maystrova et al., 2007). Різновид *Melosira italica* var. *subborealis* Nygaard був описаний з осадів озера Gribbs (Nygaard, 1956) і потім на основі подібності з *Aulacoseira subarctica* (O.Müll.) Haworth переведений до роду *Aulacoseira* як форма останньої (Haworth, 1988). Пізніше *A. subarctica* f. *subborealis* (Nygaard) Haworth отримала видовий статус – *A. subborealis* (Nygaard) Denys, Muylaert et Krammer, оскільки виявлено відмінності цієї форми від *A. subarctica* в морфології (менша довжина шипів, ареольована поверхня лицьової частини стулки, невисокий загин стулки, розташування двогубого виросту) та екології (Krammer, 1991; Denys et al., 2003).

Пізніше опубліковано діагноз іншого схожого за морфологією виду – *A. pusilla* (Tuji, Houki, 2004), а частина мікрофотографій, характерних для нього, наводиться для ілюстрацій *A. subborealis* (Denys et al., 2003). Існує також інша точка зору щодо систематичного положення *A. subarctica* f. *subborealis* – ця форма не має самостійного таксономічного рангу і є морфотипом *A. subarctica* (Gibson et al., 2003; Genkal, Kulikovskiy, 2009; Popovskaya et al., 2011).

При визначенні приналежності водоростей до *A. subborealis* ми відносили форми з невисоким загином стулки, невеликими загостреними або конусовидними з широкою основою, або притупленими шипами і

поздовжніми спіральними чи прямими рядами ареол на загині стулки, згідно діагнозу Denys et al. (2003, Figs 16, 18–24).

Таблиця. Діапазони мінливості кількісних морфологічних ознак *Aulacoseira pusilla*

Діаметр стулки, мкм	Висота загину стулки, мкм	Відношення висоти загину стулки до діаметру	Число рядів ареол у 10 мкм	Число ареол у 10 мкм штриха	Літературне джерело
6–8	1,3–4,5	–	20	–	Meister, 1913
6–10	2–10	–	20–26	25–30	Tuji, Houki, 2004
5,5–9,0	2–4	0,39–0,55	20–28	–	Houk et al., 2007
4,5–7,5	2,2–4,5	–	24–26	–	Potapova, 2010
5,5–9,0	2–4	–	23–28	28–38	Kiss et al., 2012
5,0–7,5	3–4	0,4–0,7	20–26	25–30	Tuji, 2015
5,5–9,0	2–4	0,39–0,55	20–28	(35–40)*	Houk et al., 2017
5,5–9,0	2–4	–	20–28	–	Peeters, Ector, 2017
5,3–7,9	1,2–3,2	0,16–0,58	22–26	35–40	Наші дані

* Відповідно до вимірів на мікрофотографіях.

У монографії Houk et al. (2017) на СЕМ ілюстраціях *A. subborealis* (Plate 141, Figs 13–18) шипи водорості дуже короткі у порівнянні з даними Denys et al. (2003, Figs 16, 18–22, 24). При проведенні наших досліджень ми орієнтувалися на публікацію Houk et al. (2017), тому не змогли ідентифікувати наші форми як *A. subborealis* і віднесли їх до *A. pusilla*.

В представленому нами короткому описі *A. subborealis* ми наводимо лише основні кількісні ознаки виду (діаметр стулки і висота її загину, число рядів ареол і ареол в 10 мкм на загині стулки), за винятком відношення висота загину стулки/діаметр (Maistrova et al., 2007). Вони в основному відповідають літературним даним *A. pusilla* (див. таблицю). Але мінімальні значення висоти загину стулки і, відповідно, відношення висота/діаметр відрізняються від літературних меншими показниками (див. таблицю). Доповнюємо опис виду також якісними ознаками. *Aulacoseira*

pusilla зустрічається в коротких колоніях (див. рисунок, 1, 3, 4, 5, 8, 10), що відповідає літературним даним (Tuji, Houki, 2004; Houk et al., 2007; Tuji, 2015; Houk et al., 2017).

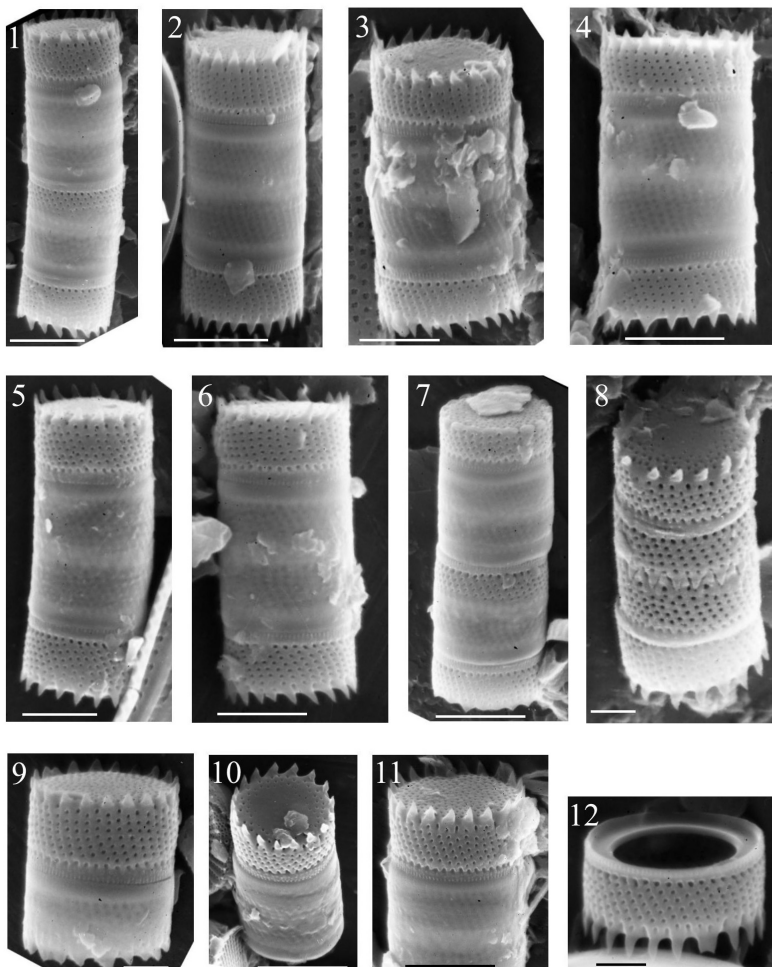


Рисунок. *Aulacoseira pusilla*: 1–9 – колонії; 10, 11 – стулки із зовнішньої поверхні; 12 – кільцеподібна діафрагма. Масштаб: 5 мкм (1–7, 10, 11), 2 мкм (8, 9, 12)

Однією з характерних ознак водорості є короткі загострені шипи; вони спостерігалися і в наших зразках (див. рисунок). На деяких стулках шипи мали невеликий нахил в сторону (див. рисунок). Аналогічні шипи у *A. pusilla* описують також інші дослідники (Houk et al., 2017; Peeters, Ector, 2017). Ареоли на лицьовій частині стулки в досліджених нами зразках розташовані широкою смугою по краю стулки (див. рисунок), за літературними даними, вони частіше розташовуються по всій поверхні (Tuji, Houki, 2004; Kiss et al., 2015; Tuji, 2015; Houk et al., 2017). Ареоли на

загині стулки, згідно з першоописом (Tuji, Houki, 2004) і літературними даними (Tuji, Houki, 2001; Potapova, 2010; Kiss et al., 2012; Tuji, 2015; Houk et al., 2017), розташовані в спіральних або майже прямих рядах. На досліджених нами стулках спостерігали таке саме розташування ареол (див. рисунок, 1–12). Кільцеподібна діафрагма, за нашими спостереженнями, широка і має потовщене кільце по внутрішньому периметру. За даними деяких авторів, вона інколи заходить всередину стулки (Houk et al., 2007, 2017; Peeters, Ector, 2017), за даними інших – майже відсутня (Kiss et al., 2012).

Висновки

Повторне вивчення морфології *Aulacoseira subborealis* з Канівського водосховища та р. Десни показало, що насправді це *A. pusilla* – новий вид для флори України.

Робота виконана за фінансової підтримки Російського фонду фундаментальних досліджень (грант № 19-04-00280).

Список літератури

- Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography.* 2007. Vol. 2. *Bacillariophyta*. Ruggell/Liechtenstein: A.R.A. Gantner Verlag. 413 p.
- Bukhtiyarova L. 1999. *Diatoms of Ukraine. Inlands waters*. Kyiv. 133 p.
- Denys L., Muylaert K., Krammer K., Joosten T., Reid M., Rioual P. 2003. *Aulacoseira subborealis* stat. nov. (*Bacillariophyceae*): a common but neglected plankton diatom. *Nova Hedw.* 77(3–4): 407–427.
- Genkal S.I., Kulikovskiy M.S. 2009. On taxonomic position of *Aulacoseira subborealis* (*Bacillariophyta*). *Bot. J.* 94(9): 1359–1370. [Генкал С.И., Куликовский М.С. 2009. О систематическом положении *Aulacoseira subborealis* (*Bacillariophyta*). *Бот. журн.* 94(9): 1359–1370].
- Genkal S.I., Maistrova N.V. 1992. Centric diatoms in phytoplankton of the Kiev and Kanev reservoirs. *Biol. Int. Water. Inform. Bull.* 93: 25–30. [Генкал С.И., Майстрова Н.В. 1992. Центрические диатомовые водоросли в фитопланктоне Киевского и Каневского водохранилищ. *Биол. внутр. вод. Информ. бюл.* 93: 25–30].
- Gibson C.E., Anderson N.J., Haworth E.Y. 2003. *Aulacoseira subarctica*: taxonomy, physiology, ecology and palaeoecology. *Eur. J. Phycol.* 38(2): 83–101.
- Haworth E.Y. 1988. In: *Algae and the aquatic environment*. Bristol: Biopress Ltd. Pp. 138–167.
- Houk V., Klee R., Passauer U. 2007. Observations on taxa of *Melosira* sensu lato among the slides from the Grunow diatom collection in Vienna (Austria). Pt 1. *Diatom Res.* 22(1): 57–80.

- Houk V., Klee R., Tanaka H. 2017. Atlas of freshwater centric diatoms with a brief key and descriptions. Second emend. edition of Part I and II. *Melosiraceae*, *Orthoseraceae*, *Paraliaceae* and *Aulacoseiraceae*. *Fottea*. 17(Suppl.): 1–616.
- Kiss K.T., Klee R., Ector L., Ács É. 2012. Centric diatoms of large rivers and tributaries in Hungary: morphology and biogeographic distribution. *Acta Bot. Croat.* 71(2): 311–363.
- Krammer K. 1991. Morphology and taxonomy of some taxa in the genus *Aulacoseira* Thwaites (*Bacillariophyceae*). *Nova Hedw.* 52(1–2): 89–112.
- Maystrova N.V., Genkal S.I., Scherbak V.I., Semenyuk N.Ye. 2007. *Centrophyceae* the upper section of the Kanev water reservoir (Ukraine). *Algologia*. 17(4): 467–475. [Майстрова Н.В., Генкал С.И., Щербак В.И., Семенюк Н.Е. 2007. *Centrophyceae* верхней части Каневского водохранилища (Украина). *Альгология*. 17(4): 467–475].
- Meister F. 1913. Beiträge zur Bacillariaceenflora Japan. *Arch. f. Hydrobiol.* (Plankt.) 8: 305–312.
- Nygaard G. 1956. The ancient and recent flora of diatoms and *Chrysophyceae* Lake Gribso. *Folia Limnol. Scand.* 8(32–94): 253–262.
- Peeters V., Ector L. 2017. *Atlas des diatomées des cours d'eau du territoire bourguignon. Vol. 1: Centriques, Araphidées*. Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement Bourgogne-France-Comté. 309 p.
- Popovskaya G.I., Genkal S.I., Likhoshway E.V. 2011. *Diatoms of the plankton of Lake Baikal: atlas and key*. Novosibirsk: Nauka. 192 p. [Поповская Г.И., Генкал С.И., Лихошвай Е.В. 2011. *Диатомовые водоросли планктона озера Байкал: атлас-определитель*. Новосибирск: Наука. 192 с.].
- Potapova M. 2010. In: *Diatoms of North America*. Retrieved Sept. 28. 2020. <https://diatoms.org/species/aulacoseira>
- Scherbak V.I., Genkal S.I., Maystrova N.V. 1992. Centric diatom algae in the phytoplankton of the Kyiv and Kanev reservoir. *Biol. Inland Waters*. Inform. Bull. 93: 25–30. [Щербак В.И., Генкал С.И., Майстрова Н.В. 1992. Центрические диатомовые водоросли в фитопланктоне Киевского и Каневского водохранилищ. *Биол. внутр. вод*. Информ. бюл. 93: 25–30].
- Simonsen R. 1979. The diatom system: ideas on phylogeny. *Bacillaria*. 2: 9–71.
- Tuji A., Houki A. 2001. *Centric diatoms in Lake Biwa*. Otsu: Lake Biwa Res. Inst. 90 p.
- Tuji A., Houki A. 2004. Taxonomy, Ultrastructure, and Biogeography of the *Aulacoseira subarctica* Species Complex. *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo*. Ser. B. 30(2): 35–54.
- Tuji A., Williams D.M. 2006. Type examination of the freshwater centric diatom *Aulacoseira pusilla* (F.Meister) Tuji et Houki. *Diatom*. 22: 70–73.

Підписав до друку П.М. Царенко

Genkal S.I. 2021. **About a new representative of the genus *Aulacoseira* Thw. (*Bacillariophyta*) for the flora of Ukraine.** *Algologia*. 31(2): 163–169

I.D. Papanin Institute for Biology of Inland Waters of RAS,
Settle Borok, Nekouz District, Yaroslavl Region 152742, Russia

In this study, scanning electron microscopy images of valves of the centric diatom algae *Aulacoseira subborealis* (Nygaard) Denys, Muylaert et Krammer from the Kaniv Reservoir and the Desna River are analyzed. The quantitative (colony size, valve diameter and mantle height, the ratio of mantle height to valve diameter, number of areola rows and areolae in 10 µm on the mantle, ring-shaped diaphragm size) and qualitative (short pointed spines, areolae arrangement on the valve face and the mantle) morphological characteristics correspond to the diagnosis of *A. pusilla* (F.Meister) A.Tuji & A.Houki, a new species for the flora of Ukraine. In the analyzed material, minimum values of the mantle height and the height/diameter ratio are lower than in the published data.

Key words: reservoirs and watercourses of Ukraine, new to flora, *Bacillariophyta*, *Aulacoseira subborealis*, *A. pusilla*, morphology, scanning electron microscopy

Фітофармакологічне дослідження водорості *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva (*Rhodophyta*) для застосування при оральних захворюваннях

Шаран Л.В., Венніла Дж.Дж.*

Кафедра біотехнології Школи сільського господарства та біологічних наук,
Інститут технологій та наук Каруної (Університет), Коїмбатор, Індія
*jannetvennila@gmail.com

Надійшла до редакції 01.12.2020. Після доопрацювання 06.01. 2020. Підписана до друку 11.02.2021.
Опублікована 29.06.2021

Реферат. Наведено результати дослідження фітофармакологічних властивостей морської червоної водорості *Kappaphycus alvarezii*, які можуть бути використані при захворюваннях порожнини рота. Ротові інфекції (гінгівіт та пародонтит) і рак порожнини рота все частіше трапляються у країнах, що розвиваються. Продукти з протибактеріальною та протіоксидантною активністю можуть забезпечити комбінований підхід до лікування уражень ротової порожнини. Морські водорості є резервуаром багатьох біоактивних сполук і вважаються потенційними кандидатами для використання у природній фармацевтиці. *Kappaphycus alvarezii* – морська водорість, яка широко культивується для харчових потреб. Для екстракції біоактивних компонентів водорості використовували розчинники різної полярності (етанол, етилацетат та хлороформ), фітохімічний аналіз здійснювали методом газової хроматографії/мас-спектрометрії, також вивчали їхню протіоксидантну, протимікробну та цитотоксичну активність. Всі екстракти *K. alvarezii* показали хорошу протіоксидантну активність та потенційну ефективність щодо патогенних мікроорганізмів ротової порожнини. Екстракт на основі етилацетату мав кращу протіоксидантну, протимікробну та цитотоксичну дію порівняно з хлороформними та етанольними екстрактами. Показано, що екстракти *K. alvarezii* є безпечними для нормальних клітин Vero, а їх інгібуюча активність на ракові клітини ротової порожнини (клітинні лінії KB-3-1) виявилася низькою. Ці висновки свідчать про можливість використання *K. alvarezii* у стоматологічній практиці для боротьби з інфекціями порожнини рота.

Ключові слова: *Kappaphycus alvarezii*, морські водорості, захворювання порожнини рота, пародонтит, протіоксидантна, протимікробна та цитотоксична активність

© Шаран Л.В., Венніла Дж.Дж., 2021

Вступ

Здоров'я порожнини рота – важлива складова тривалого та повноцінного способу життя. Здорова ротова порожнина свідчить про здорове тіло, підвищує самооцінку, впевненість у собі та покращує соціальну взаємодію. Захворювання ротової порожнини не обмежуються порожниною рота, вони сприяють розвитку інших хронічних захворювань, таких як діабет, серцево-судинні захворювання, передчасні пологи, низька вага та ревматоїдний артрит. Приблизно 100% дорослих та 60–90% дітей мають проблеми із зубами. Карієс, гінгівіт, пародонтоз, втрата зубів, рак порожнини рота, бактеріальні, грибові та вірусні інфекції – це лише деякі захворювання порожнини рота, занесені до списку Всесвітньої організації охорони здоров'я. У більшості промислово розвинутих країн чи країн, що розвиваються, хвороби порожнини рота є четвертим вартісним захворюванням, яке підлягає лікуванню (Godha et al., 2015).

Патогенез захворювань порожнини рота пов'язаний з різними причинами, серед яких інфекції, вірулентні білки, вивільнення вільних радикалів та окислювальний стрес, а також загибель/некроз клітин. Бажано, щоб продукти з потужною протибактеріальною та протіоксидантною активністю могли забезпечити комбінований підхід для лікування розладів ротової порожнини (Cherian et al., 2019). Головними проблемами вже існуючих антибіотиків є стійкість до них бактерій та токсичність. Тому виявлення нових протибактеріальних сполук із природних джерел є нагальною необхідністю.

Фітокомпоненти водоростей вважаються потенційними кандидатами для застосування як продукти для здоров'я людини, а також джерелом харчування. Морські водорості – це резервуар цінних біоактивних сполук із різноманітною структурою, що приваблює дослідників великим потенціалом фармацевтичного ринку. Біоактивні сполуки виділяють із водоростей за допомогою органічних розчинників (метанол, етанол, етилацетат, хлороформ, бутанол, гексан та ін.). Розчинники на основі вуглецю застосовуються у фармацевтичній, харчовій, косметичній та нафтовій промисловості. Вони відрізняються щільністю, температурою кипіння, змішуваністю, що допомагає виділити широкий спектр біоактивних сполук із природних джерел (Miazek et al., 2017). Дослідження деяких вторинних метаболітів, таких як поліфеноли, терпени, стерини, ацетогеніни, що продукуються морськими макроводоростями, показало широкий спектр їх біологічної активності (Sumaуа, Murugan, 2018).

Морська макроскопічна червона водорість *Gracilaria alvarezii* культивується в Індії, Філіппінах, Китаї, Японії та Кореї для комерційного видобутку каррагенану – полісахариду, який завдяки його желуючим та в'язучим властивостям використовується у різних галузях харчової та фармацевтичної промисловості. Ця водорість має різноманітні лікувальні

властивості, включаючи протидіабетичну (Nagarani, Kumaraguru, 2012; Сугіас, Eswaran, 2016) та активність α -амілази (Balasubramaniam et al., 2013). Проведені нами біохімічні дослідження виявили, що морський бромофенол, потужний природний метаболіт, присутній у *K. alvarezii*, може стримувати та контролювати вірулентні білки, що виробляються патогеном пародонтозу *Porphyromas gingivalis in vitro* (Cherian et al., 2019). Хоча були проведені різноманітні дослідження *K. alvarezii* з метою вивчення його лікувальної активності, а також фітохімічного складу, досі немає жодного спеціального дослідження, яке б підтвердило медичну активність його фітокомпонентів у захисті ротової системи.

У даному дослідженні основна увага приділена терапевтичному потенціалу *K. alvarezii* у лікуванні захворювань ротової порожнини. Екстракцію з біомаси *K. alvarezii* здійснювали за допомогою розчинників різної полярності, а фітохімічний аналіз проводили методом газової хроматографії/мас-спектрометрії (GC-MS). Протибактеріальна та протіоксидантна активність одержаних екстрактів була досліджена стосовно їх фітохімічних компонентів. Життєздатність клітин та протиракову активність екстрактів *K. alvarezii* вивчали на лініях нормальних клітин (Vero) та клітин раку ротової порожнини (KB-3-1).

Матеріали та методи

Біомаса *Kappaphycus alvarezii* була закуплена в агропромисловій фірмі Prasmo Agro Private limited, Кумбаконам, Тамілнад, Індія, мікроорганізми для вивчення протимікробної активності придбані у MTCC (Колекція культур мікробних типів, Інститут мікробних технологій, Чандігарх, Індія). Задіяні в експериментах мікроорганізми – грампозитивні *Staphylococcus aureus* (MTCC 3160) і *Bacillus subtilis* (MTCC 441), грамнегативні *Escherichia coli* (MTCC 1687), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 741), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 109) та грибок *Candida albicans* (MTCC 7253) – підтримувалися згідно з протоколом, визначеним Інститутом клінічних та лабораторних стандартів (CLSI). УФ-поглинання зчитували за допомогою спектрофотометра (U-2910 HITACHI УФ-видимий спектрофотометр). Галова кислота, кверцетин, фенольний реагент Фоліна-Чокальтеу (FC), карбонат натрію (Na_2CO_3), нітрит натрію, гексагідрат хлориду алюмінію ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), гідроксид натрію (NaOH), β -каротин, аскорбінова кислота, нітропрусид натрію, нітросиній тетразолій (NBT), феназин метосульфат (PMS), нікотинамід-аденин-динуклеотид (NADH), 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразил (DPPH), перекис водню (H_2O_2), ципрофлоксацин та флуконазолд отримані від компанії Sigma, США.

Підготовка екстракту

Таломи водорості промивали, видаляли епіфіти, висушували в тіні, подрібнювали та зберігали у холодильнику. 25 г порошку *K. alvarezii* екстрагували в апараті Сокслета 250 мл розчинників різної полярності: етанолом (КАЕ), етилацетатом (КАЕА) і хлороформом (КАС). Екстракти фільтрували (фільтрувальний папір Whatman № 1), концентрували (40 °С, роторний вакуумний випарник) і сушили. Висушені екстракти зберігали при -20 °С до подальшого використання. Відсоток виходу екстрактів *K. alvarezii* розраховували за формулою, зазначеною нижче (Akwu et al., 2019):

Відсоток виходу екстракту = (маса висушеного екстракту *K. alvarezii*, г) / (маса висушеного *K. alvarezii*, г) × 100.

Фітохімічний аналіз

Попередній фітохімічний скринінг екстрактів КАЕ, КАЕА та КАС здійснювали за Banu, Cathrine (2015). Подальше вивчення фітосполук проводили за допомогою мас-спектрометрії/газової хроматографії (GC-MS) (модель Trace GC Ultra та DSQII, Thermo Fisher Scientific Limited). Параметри встановлювали наступним чином: температуру порту форсунки, джерела та інтерфейсу підтримували на рівні 250 °С, 220 °С та 250 °С відповідно. Температуру печі програмували на 2 хв при 70 °С, 150 °С при 8 °С/хв, до 260 °С при 10 °С/хв. Співвідношення розбиття 1 : 50 і використаний інжектор був із режимом без розщеплення. Неполарна колонка з розмірами 0,25 мм ID × 0,25 мкм OD × 30 м довж., придбана в Agilent Co., США. Гелій (газ-носіє) поступав зі швидкістю 1 мл/хв. Діапазон сканування мас-спектрометрії 50–650 Да. При 200 °С джерело підтримувалося з тиском вакууму двигуна менше 40. Енергія іонізації – 70eV. Нейтральні частинки були зменшені вбудованим фільтром MS. Для ідентифікації спектру використані дві вбудовані бібліотеки системи даних NIST 4 та WILEY 9, які мали понад 5 млн посилок. З'єднання з досконалими спектральними значеннями ≥ 700 розглядалися лише як позитивна ідентифікація (Ganesh, Vennila, 2011; Rajesh et al., 2016). У сирих екстрактах *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА, КАС) визначали вміст загальних фенолів та флавоноїдів.

Визначення загального вмісту фенолів (TPC)

Загальний вміст фенолів в екстрактах *K. alvarezii* визначали методом реагенту FC (Singleton, 1999). Фенольний реагент FC розбавляли у співвідношенні 1.0 : 10. 5 мл розведеного реагенту та 4 мл Na₂CO₃ (7,5% w/v) додавали до 1 мл різних екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС).

Суміш інкубували у темряві протягом 2 год за кімнатної температури, потім зчитували поглинання спектру при 765 нм за допомогою спектрофотометра. Галову кислоту використовували як стандарт і для калібрування. Всі зразки підготовлені та досліджені в трьох повторностях. Значення ТРС виражали як мг еквівалентів галової кислоти (GAE)/г.

Визначення загального вмісту флавоноїдів (TFC)

Загальний вміст флавоноїдів визначали за допомогою колориметричного аналізу хлориду алюмінію (Ling et al., 2015). 1 мл екстрактів *K. alvarezii* змішували з 4 мл дистилляту, додавали 3 мл 5%-го NaNO_3 , через 5 хв додавали 0,6 мл 10%-ний $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Одержану суміш інкубували 6 хв при кімнатній температурі, потім додавали 2 мл 1 М NaOH . Поглинання вимірювали при 510 нм за допомогою спектрофотометра. TFC розраховували як еквіваленти кверцетину (QE) у мг/г екстракту зразка.

Визначення протиокисдантної активності

Активність вилучення радикалів методом DPPH

Радикал-поглинаючу активність різних екстрактів *K. alvarezii* визначали відповідно до модифікованого протоколу, прийнятого Ling et al. (2015). 100 мкл DPPH (200 мкМ у метанолі) додавали до 100 мкл КАЕ, КАЕА та КАС з різною концентрацією (20–100 мкг/мл) у мікропланшет з 96 лунками. Інкубували протягом 30 хв при кімнатній температурі та вимірювали поглинання при 520 нм з метанолом у якості бланку. Аскорбінову кислоту використовували як позитивний контроль. Активність вилучення радикалів за методом DPPH (A_{DPPH} , %) розраховували наступним чином:

$$A_{\text{DPPH}} = (A_{\text{Blank}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Blank}} \times 100.$$

IC_{50} розраховували за графіком лінійної регресії.

Аналіз вилучення радикалів із використанням оксиду азоту

Аналіз вилучення радикалів із використанням NO визначали за модифікованим протоколом, описаним Pradeep et al. (2018). 50 мкл нітроприсида натрію (10 мМ), фосфатного буфера (1 мМ) та КАЕ, КАЕА та КАС (20–100 мкг/мл) змішували та інкубували 90 хв при 25 °C. Поглинання зчитували при 546 нм після додавання 100 мкл реагенту Гріса. Активність поглинання радикалів за оксидом азоту (A_{NO} , %) розраховували наступним чином:

$$A_{\text{NO}} = (A_{\text{Blank}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Blank}} \times 100.$$

IC_{50} розраховували за графіком лінійної регресії.

Активність вилучення радикалів із використанням супероксиду

Активність вилучення радикалу супероксиду (SO) визначали згідно Ramamoorthy et al. (2018). 300 мкМ нітросинього тетразолію (NBT), 60 мкМ феназінметасульфату (ПМС), 468 мкМ NADH (нікотинамід-аденін-динуклеотид) готували в 16 мМ *трис*-HCl-буфері з pH 8,0. 50 мкл NADH, NBT змішували з екстрактами КАЕ, КАЕА та КАС різних концентрацій (20–100 мкг/мл) і поміщали у мікропланшет з 96 лунками. Додавали розчин PMS, який ініціює реакцію окисленням NADH, щоб виділити супероксидний радикал і зменшити NBT. Суміші інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв і зчитували поглинання при 560 нм. Активність вилучення радикалів шляхом інгібування супероксиду (A_{SO} , %) розраховували наступним чином:

$$A_{SO} = (A_{Blank} - A_{Sample}) / A_{Blank} \times 100.$$

IC₅₀ розраховували за графіком лінійної регресії.

Аналіз вилучення радикалів із використанням перекису водню

Аналіз вилучення перекису водню (H₂O₂) проводили модифікованим методом, адаптованим до Pradeep et al. (2018). До 20 мкл H₂O₂ (10 мМ) додавали 100 мкл екстрактів КАЕ, КАЕА та КАС різних концентрацій (20–100 мкг/мл) та поміщали у мікропланшет. Додавали фосфатний буфер (100 мкл) pH 5 (0,1 М), інкубували планшет при 37 °C протягом 10 хв, зчитували абсорбцію при 230 нм. Антирадикальну активність за пригніченням реакції перекисного окислення ($A_{H_2O_2}$, %) розраховували згідно з наведеним нижче рівнянням:

$$A_{H_2O_2} = (A_{Blank} - A_{Sample}) / A_{Blank} \times 100.$$

IC₅₀ розраховували за графіком лінійної регресії.

*Експерименти in vitro**Дослідження протимікробної активності*

Для дослідження протимікробної активності було відібрано декілька мікроорганізмів, відомих як збудники хвороб ротової порожнини та внутрішньолікарняних інфекцій. Протибактеріальну та протигрибову активність різних екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) визначали методом дифузії агарової свердловини. Стандартні препарати ципрофлоксацин та флуконазол (Sigma-Aldrich) використовували як позитивний контроль для бактерій та грибків відповідно. Культуру вирощували при 37 °C протягом 24 г на поживному бульйонному середовищі (бактерії) при 30 °C протягом 48 г на картопляному середовищі з декстрозою (гриби). Інокуляти готували розчиненням добових культур у фізіологічній суспензії (0,9% NaCl) і регулювали розчин до отримання

каламутності 0,5 за стандартом Мак-Фарленда (106 КУО/мл). Стерилізований агар Мюллера Хінтона виливали на чашку. Після затвердіння агару посівний матеріал наносили на його поверхню за допомогою стерильного ватного тампона. Свердловини діаметром 10 мм робили за допомогою стерильного пробкового бура. У свердловини додавали різні концентрації КАЕ, КАЕА та КАС, розчинених у диметилсульфоксиді (20–100 мкг/мл). Стандартні препарати (40 мкг/мл) додавали у відповідні свердловини. Чашки інкубували протягом 18–24 год при 37 °С (бактерії) або 48 год при 30 °С (гриби). Експеримент проводили у трьох повторностях, спостерігали і вимірювали зону гальмування росту та протимікробну активність (Muhaidat et al., 2015).

Життєздатність клітин та цитотоксичні дослідження

Для вивчення життєздатності клітин та цитотоксичної активності екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) застосовували 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолій бромід. Аналіз на тіазоліловий синій (МТТ) був використаний для вивчення життєздатності клітин та цитотоксичної активності екстрактів *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) у нормальних (клітинні лінії Vero) та клітинних лініях раку ротової порожнини (KB-3-1). Клітини Vero – це лінія нормальних фібробластів, отриманих від африканської зеленої мавпи, що широко використовується у дослідженнях цитотоксичності, росту та диференціації клітин (Elkady, Ramadan, 2016). Лінія KB-3-1 – це епідермоїдні клітини оральної карциноми людини (Dai et al., 2009). Ці лінії клітин були придбані в Національному науковому центрі раку, Пуна, Індія, підтримувалися і культивувалися у модифікованому середовищі Дульбекко (DMEM), доповненому пеніциліном (100 одиниць/мл), глютаміном (2 мкМ), 10%-ю фетальною бичачою сироваткою (FBS) та стрептоміцином (100 мкг/мл). Потім клітини культивували в інкубаторі вуглекислого газу зі зволоженням 5% при 37 °С.

Клітини лінії Vero та KB 3-1 покривали двома різними 96-лунковими мікропланшетами з плоским дном (1×10^4 клітини на лунку), інкубованими протягом 24 год. Екстракти *K. alvarezii* після дворазового послідовного розведення (100–1,562 мкг/мл) додавали до клітин, інкубували 24 год з подальшим додаванням 10 мкл МТТ та інкубацією протягом 4 год. Середовище викидали, додавали 50 мкл ДМСО і 5–6 разів набирали та випускали піпеткою для розчинення кристалів формагану, що утворилися, для надання фіолетового кольору. Поглинання зчитували при 540 нм. Розрахунки проводили за формулою:

$$\% \text{ життєздатності клітин} = (\text{середня ОД зразка}) / (\text{ОД контролю}) \times 100.$$

Була побудована крива доза-реакція концентрації зразка (мкг/мл) проти життєздатності клітин (%). Розраховували значення IC_{50} (концентрація, смертельна для 50% клітин) (Kumar et al., 2018).

Статистичний аналіз

Для порівняння значущості різних екстрактів було проведено однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), а потім тест Тьюкі. Для порівняння різниці значущості різних екстрактів та контролю використовували критерій Даннета. Концентрацію IC_{50} розраховували за допомогою рівняння нелінійної регресії. Статистичний аналіз проводили за допомогою GraphPad Prism версії 7.00 для програмного забезпечення Windows (Програмне забезпечення GraphPad, La Jolla California, США).

Результати

Водорість *K. alvarezii* екстрагували етанолом (КАЕ), етилацетатом (КАЕА) та хлороформом (КАС). Відсотковий вихід висушеного екстракту з розчинником становив 7,268% (1,817 г), 5,252% (1,313 г) і 5,576% (1,394 г) для КАЕ, КАЕА та КАС відповідно.

Фітохімічний скринінг

Попередній фітохімічний скринінг виявив наявність алкалоїдів, фенолів, стеринів, стероїдів, дитерпеноїдів, флавоноїдів, сапонінів, глікозидів, білків, амінокислот та вуглеводів (рис. 1).

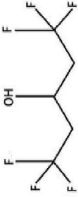
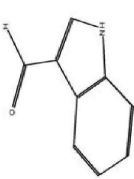
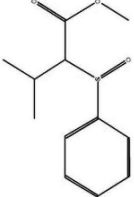
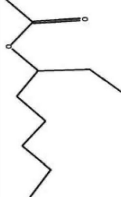
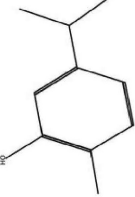
Результати мас-спектрометрії / газової хроматографії (GC-MS) екстрактів *K. alvarezii* свідчать про наявність у них різноманітних летких фітосполук з протибактеріальною та протиокисдантною активністю (табл. 1–3). В екстракті КАЕ містяться 19 таких сполук, у КАЕА – 8, у КАС 11. Ці сполуки з функціональними групами, такими як алкани, алкени, феноли, жирні кислоти, складні ефіри та альдегіди, мають лікувальні властивості.

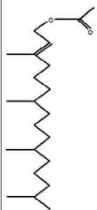
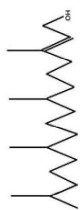
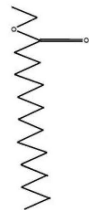
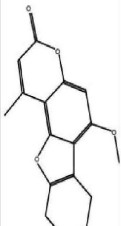
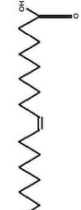
Загальний вміст фенолу та флавоноїдів

Загальний вміст фенолу (TPC) був помірно вищим у КАС, ніж в інших екстрактах. У екстракті КАЕА відмічено найвищий показник загального вмісту флавоноїдів (TFC) (табл. 4).

Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення ($n = 3$), статистично значущі при $p < 0,05$. Був проведений однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), а потім групувальні тести Тьюкі; КАЕ – етанольний екстракт *K. alvarezii*, КАЕА – етилацетатний, КАС – хлороформний. GAE: еквівалент галоїдної кислоти. QE: еквіваленти кверцетину.

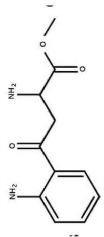
Таблиця 1. Хромато-мас-спектрометричний аналіз фітосполук з етанольного екстракту *Karrerihus alvagezi* (КАЕ)

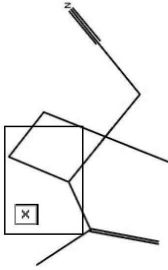
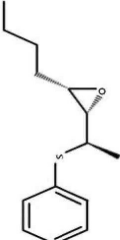
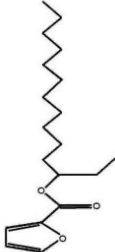
№	Час утримання	Площа піку	Назва	Група	Структура	Молекулярна формула	Молекулярна вага	Біологічність
1	5.57	0.86	1,1,1,5,5,5-гексафторпентан-3-ол	Галогеновані спирти		$C_5H_6F_6O$	196	Протимікробна, протиракова
2	6.21	1.07	ІН-індол-3-карбоксальдегід (CAS)	Індол-альдеїди		C_9H_7NO	145	Протимікробна
3	6.92	0.64	Метил 3-метил-2-фенілсульфонілбутаноат	Феніл		$C_{12}H_{16}O_3S$	240	Протіоксидантна, протибактеріальна
4	10.00	0.63	3-октилцетат	Похідні жирних кислот		$C_{10}H_{20}O_2$	172	Протимікробна
5	10.35	2.83	Фенол, 2-метил-5-(1-метилетил) (CAS)	Феніл		$C_{10}H_{14}O$	150	Протіоксидантна, протибактеріальна

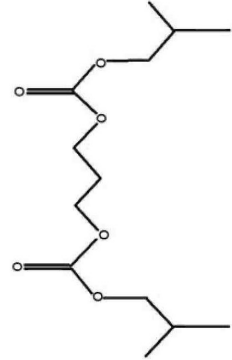
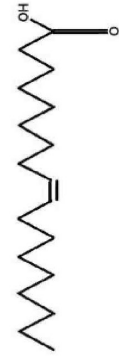
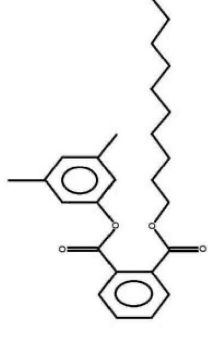
6	17,11	0,73	Бензотрицикло[5.3.0.0.(2,10)] дека-3,5,8-триен-1-D1	Похідні бензолу		$C_{14}H_{11}D$	180	Протимікробна
7	18,76	4,30	Фітолуацетат	Ефіри		$C_{22}H_{42}O_2$	338	Протимікробна
8	19,78	1,36	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен- 1-ол	Алкани		$C_{20}H_{40}O$	296	Протимікробна
9	23,02	52,78	Етиловий ефір гексадеканової кислоти (CAS)	Метиллові ефіри жирних кислот		$C_{18}H_{36}O_2$	284	Протимікробна
10	25,44	0,91	Докозан	Вищі алкани		$C_{22}H_{46}$	310	Протиоксидантна, протибактеріальна
11	26,71	3,32	6,7,8,9-тетрагідро-10-метоксн-4- метилбензофуоро[2,3, -f] кумарин	Метильовані бензильовані сполуки		$C_{17}H_{16}O_4$	284	Протиракова
12	27,36	1,24	Трикозан	Вищі алкани		$C_{23}H_{48}$	324	Протиоксидантна, протибактеріальна, протиракова
13	28,54	0,98	9-октадеценамід, (Z) (CAS)	Метиллові ефіри жирних кислот		$C_{18}H_{35}NO$	282	Протиоксидантна, протибактеріальна, протиракова

14	28,87	1,71	Тетракозан	Вищі алкани		$C_{24}H_{50}$	338	Протиоксидантна, протибактеріальна
15	30,13	2,86	Пентакозан	Вищі алкани		$C_{25}H_{52}$	352	Протиоксидантна, протибактеріальна
16	31,29	1,00	Гексакозан	Вищі алкани		$C_{26}H_{54}$	366	Протиоксидантна, протибактеріальна, Протиракова
17	32,09	0,48	Пальмітоїлхлорид	Жирні кислоти		$C_{16}H_{31}ClO$	274	Протимікробна

Таблиця 2. Хромато-масс-спектрометричний аналіз фітосполук з етилацетатного екстракту *Carprarhycus alvarezi*

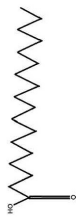
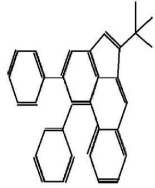
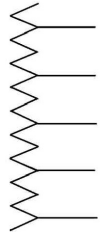
№	Час утримання піку	Площа піку	Назва	Група	Структура	Молекулярна формула	Молекулярна вага	Біоактивність
1	3,14	1,48	Аланіну 3-антранілоїл-, метиловий ефір, дл-	Похідні амінокислот ;		$C_{11}H_{14}N_2O_3$	222	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини

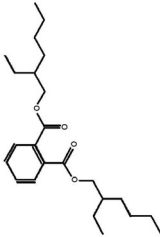
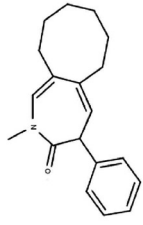
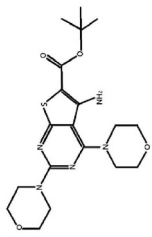
2	18,78	31,05	Циклобутан- ацетонітрил 1-метил- 2(1-метилетил)-		$C_{10}H_{15}N$	149	Протиракова
			Метил				
3	23,10	34,32	(2R, 3S, 4S) -3,4- епокси-2- фенілтіооктановий ізомер		$C_{14}H_{20}OS$	236	Протиракова
			Фенольні кетони				
4	24,22	0,61	3-тетрадециловий ефір 2-фуранкарбонової кислоти		$C_{19}H_{32}O_3$	308	Протіоксидант, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
			Ефіри				
5	26,75	2,35	Октадеценова кислота (CAS)		$C_{22}H_{44}O_4$	284	Протіоксидант, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
			Жирні кислоти				

6	27,95	0,81	Ізобутилпропан-1,3-диілідикарбонат	Заміщені алкани		$C_{13}H_{24}O_6$	276	Протимікробна
7	28,58	2,32	9-октадеенова кислота (Z) - (CAS)	Жирні кислоти		$C_{18}H_{34}O_2$	282	Протіоксидантна, протибактеріальна
8	37,75	0,54	Децил 3,5-диметилфеніловий ефір фталевої кислоти	Терпеноїди		$C_{26}H_{34}O_4$	410	Протіоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини

Таблиця 3. Хромато-мас-спектрометричний аналіз фітосполук з хлороформного екстракту *Carthamus abvaregii*

№	Час утримання	Площа піку	Назва	Група	Структура	Молекулярна формула	Молекулярна вага	Біоактивність
1	6.87	1.42	2-метиловий ефір бутенової кислоти	Метиліві ефіри жирних кислот		$C_5H_8O_2$	100	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
2	20.98	0.47	1-гексадеканола	Метиліві ефіри жирних кислот		$C_{16}H_{34}O$	242	Протиоксидантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
3	23.09	10.23	Метил 3-метил-2-фенілсульфонілбутаноат	Феніл		$C_{13}H_{11}NO_2$	213	Протиоксидантна, протибактеріальна
4	25.07	3.58	3-октилацетат	Похідні жирних кислот		$C_{23}H_{36}O_2Si_2$	4242	Протиоксидантна, протибактеріальна

5	26.80	2.45	Фенол, 2-метил-5-(1-метилетил) (CAS)	Феніл		$C_{18}H_{26}O_2$	284	Протиокси-дантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
6	28.58	0.90	Бензотрицикло[5.3.0.0.(2,10)] дека-3,5,8-триен-1-D1	Похідні бензолу		$C_{16}H_{22}O_2$	256	Протиокси-дантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини
7	29.61	0.76	Фітолуацетат	Ефіри		$C_{32}H_{56}$	410	Протиокси-дантна, протибактеріальна
8	30.16	5.09	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол	Алкани		$C_{25}H_{52}$	352	Протиокси-дантна, протибактеріальна, лікування хвороб ротової порожнини

9	33.32	6.03	Етиловий ефір гексадеканової кислоти (CAS)	Метиліві ефіри жирних кислот		$C_{24}H_{48}O_2$	Протіоксидантна, протибактеріальна	390
10	36.46	5.23	Етиловий ефір гексадеканової кислоти (CAS)	Метиліві ефіри жирних кислот		$C_{30}H_{52}O_2$	Протіоксидантна, протибактеріальна	267
11	39.09		6,7,8,9-тетрагідро-10- метокси-4- метилбензофуран[2,3, -f] кумарин	Карбоксилати		$C_{23}H_{26}N_2O_4$	Протіоксидантна, протиракова	421

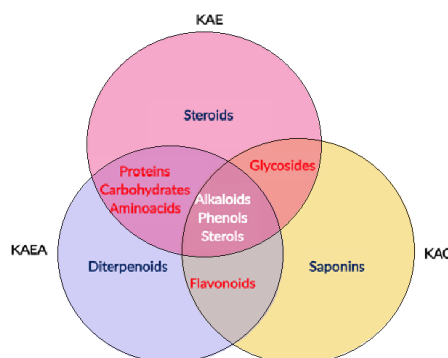


Рис. 1. Результати фітохімічного скринінгу екстрактів *Kappaphycus alvarezii*. КАЕ – етанольний екстракт; КАЕА – етилацетатний; КАС – хлороформний

Таблиця 4. Загальний вміст фенолу та флавоноїдів в екстрактах *Kappaphycus alvarezii*

Сирий екстракт	Загальний вміст фенолів, мг GAE/г	Загальний вміст флавоноїдів, мг QE/г
КАЕ	26.802 ± 0.000402	0.0356 ± 0.03
КАЕА	26.795 ± 0.000173	0.269 ± 0.04 ^{ns}
КАС	26.154 ± 0.000574	0.222 ± 0.01 ^{ns}

Протиоксидантна активність

Протиоксидантна активність екстрактів *K. alvarezii* представлена в табл. 5. Всі екстракти (КАЕ, КАЕА та КАС) показали значно вищу протиоксидантну активність у порівнянні зі стандартною аскорбіновою кислотою.

Таблиця 5. Протиоксидантна активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii*

Екстракт	DPPH (IC ₅₀ мкг/мл)	NO (IC ₅₀ мкг/мл)	SO (IC ₅₀ мкг/мл)	H ₂ O ₂ (IC ₅₀ мкг/мл)
КАЕ	52.06 ± 0.21	172.7 ± 0.007	36.75 ± 0.09	23.74 ± 0.06
КАЕА	54.02 ± 0.24	240.8 ± 0.21	54.42 ± 0.31	23.88 ± 0.11
КАС	53.55 ± 0.42	140.5 ± 0.13	50.35 ± 0.24	9.603 ± 0.12
Аскорбінова кислота	30.01 ± 0.31	37.82 ± 0.02	20.41 ± 0.05	4.421 ± 0.03

Результати дослідження методом DPPH показали активність вилучення радикалів екстрактами в порядку КАЕА > КАС > КАЕ. Порядок активності в аналізі такий: NOКАЕА > КАЕ > КАС. Аналіз SO виявив активність очищення в порядку КАЕА > КАС > КАЕ. А для аналізу H₂O₂ активність очищення виявлена в порядку КАЕА > КАЕ > КАС.

Значення IC₅₀ представлені як середнє значення ± стандартне відхилення ($n = 3$). Статистичну різницю у значущості отримували шляхом порівняння дії екстрактів *K. alvarezii* з контролем – аскорбіновою кислотою ($p < 0,05$ ANOVA з подальшими тестами Даннета). КАЕ – етанольний екстракт *K. alvarezii*, КАЕА – етилацетатний, КАС – хлороформний.

Протимікробна активність щодо патогенних мікробів ротової порожнини

Протимікробна активність КАЕ, КАЕА та КАС при концентрації 20 мкг/мл була нульовою. Однак зі збільшенням концентрації до 40 мкг/мл спостерігалось збільшення протимікробної активності проти грам-позитивних і грамнегативних бактерій (рис. 2, 3).

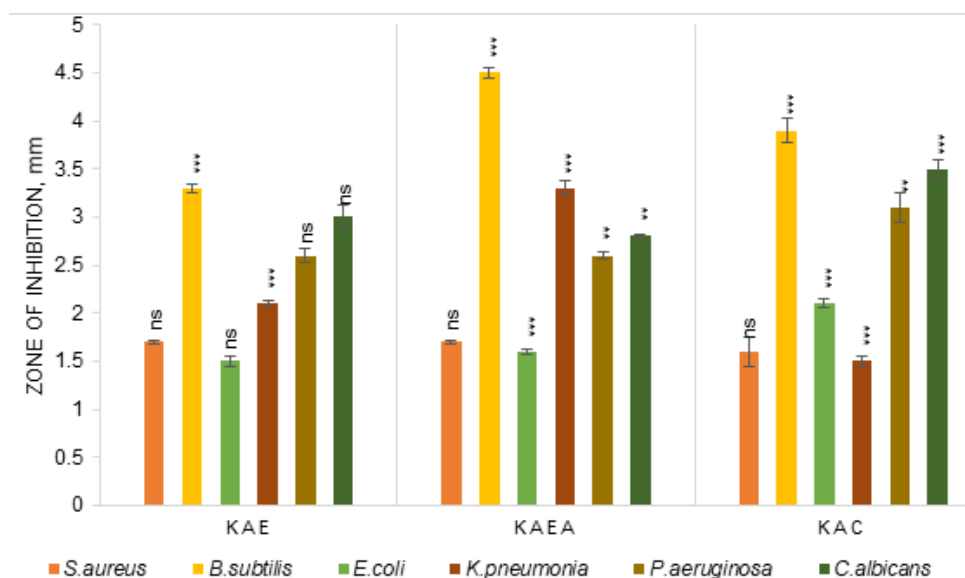


Рис. 2. Протимікробна активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо патогенних мікробів ротової порожнини.

КАЕ – етанольний екстракт *K. alvarezii*, КАЕА – етилацетатний, КАС – хлороформний. Кожна точка виражається як середнє ± стандартне відхилення у трьох повторностях. Статистично значуще $p < 0,05$. Однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), потім тест Тьюкі. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns – несуттєві. Протимікробна активність ципрофлоксацину та флуконазолу була надзвичайно високою навіть при найнижчій концентрації, тому не включена до діаграми

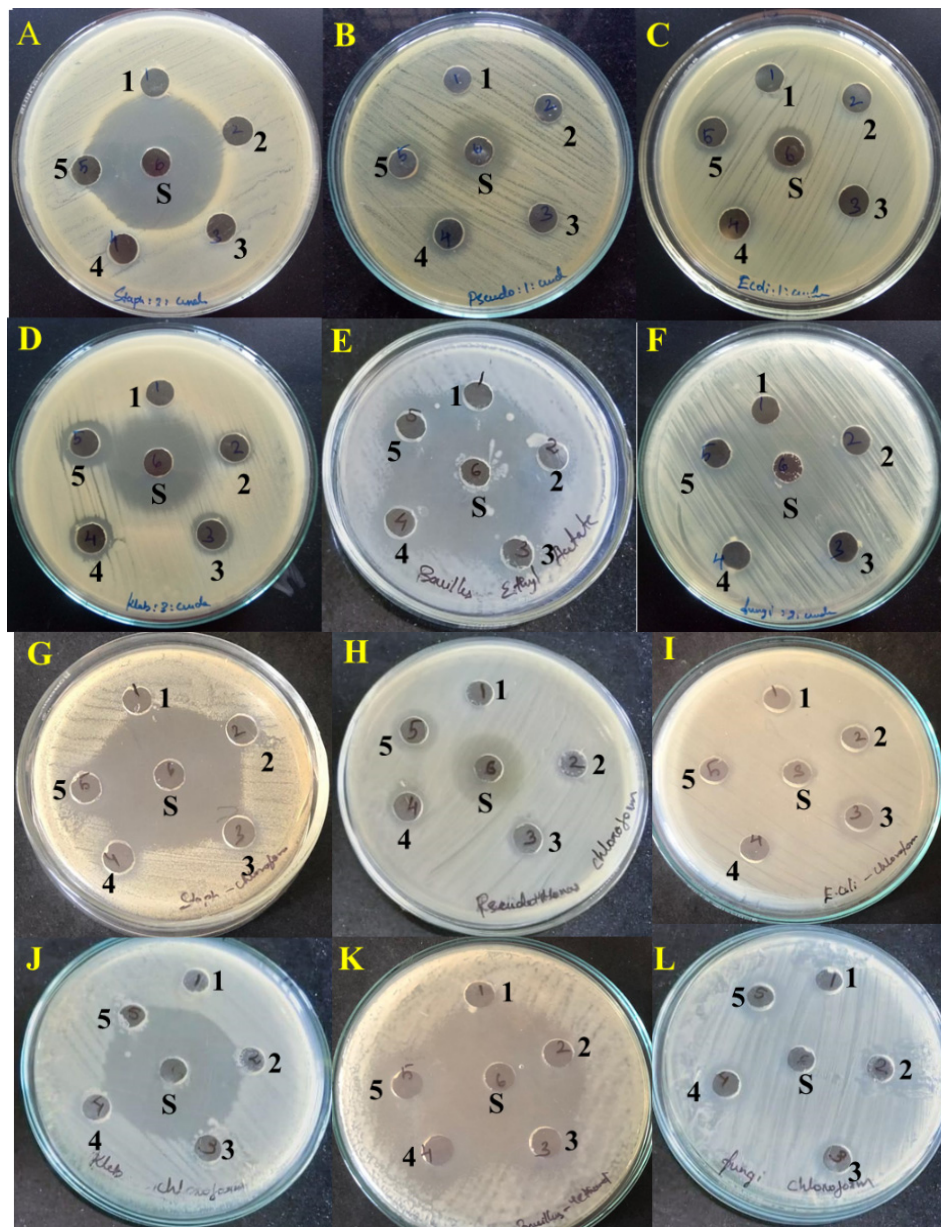
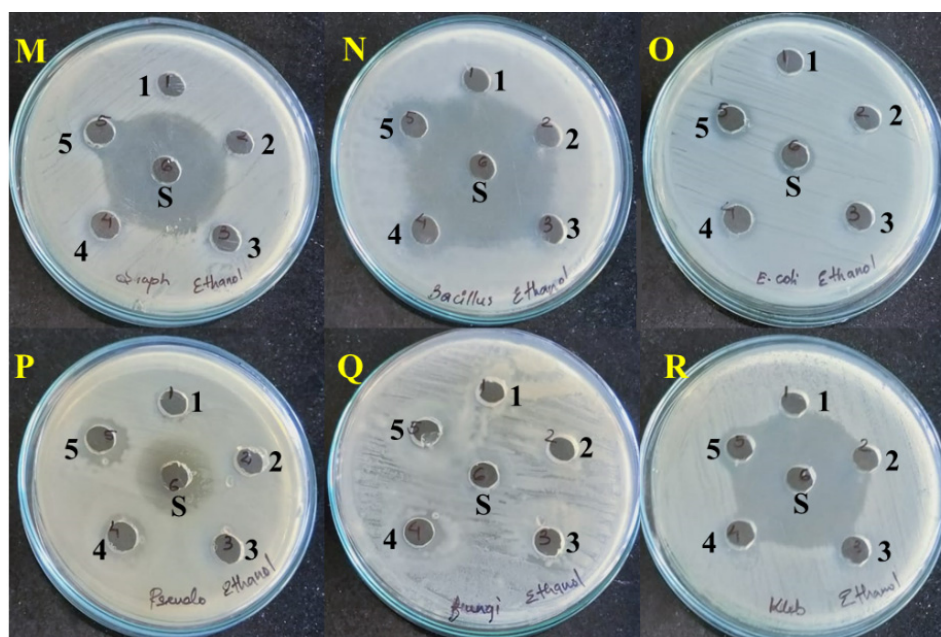


Рис. 3. Протимікробна активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherchia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Candida albicans*. А – F – екстракт КАЕА, G – L – екстракт КАС,



М – R – екстракт КАЕ. Концентрації екстрактів, мкг/мл: 1 – 20; 2 – 40; 3 – 60; 4 – 80; 5 – 100. S – стандартні препарати ципрофлоксацин та флуконазол використовували як позитивний контроль для бактерій та грибів відповідно

Однак активність тестованих екстрактів *K. alvarezii* була меншою, ніж у стандартних препаратів ципрофлоксацин та флуконазол. КАЕА був більш ефективним проти *Bacillus subtilis* та *Klebsiella pneumoniae*, а КАС більш ефективним проти *B. subtilis* та *Candida albicans*. Стосовно *Staphylococcus aureus* протимікробна активність усіх екстрактів була однаковою.

Дослідження цитотоксичності

Аналіз цитотоксичності проводили для оцінки токсичності одержаних екстрактів шляхом моніторингу росту клітин в умовах *in vitro*. Цитотоксичність екстрактів КАЕ, КАЕА та КАС на клітинних лініях Vero та KB-3-1 визначали за допомогою аналізу МТТ. Як видно з рис. 4 і табл. 6, екстракт КАЕ показав більший відсоток життєздатності клітин у нормальних клітинах Vero (IC_{50} мкг/мл: $178,87 \pm 0,112$), за ним КАЕА (IC_{50} мкг/мл: $151,95 \pm 0,123$) та КАС (IC_{50} мкг/мл: $149,48 \pm 0,322$). Встановлено, що цитотоксична дія екстрактів *K. alvarezii* має порядок КАЕА > КАС > КАЕ.

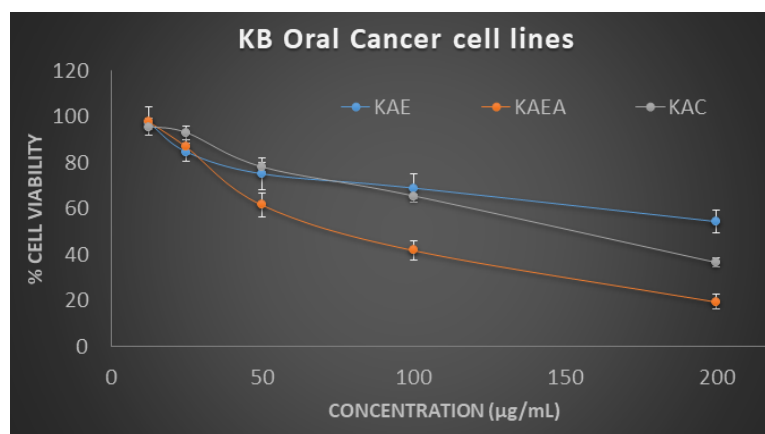
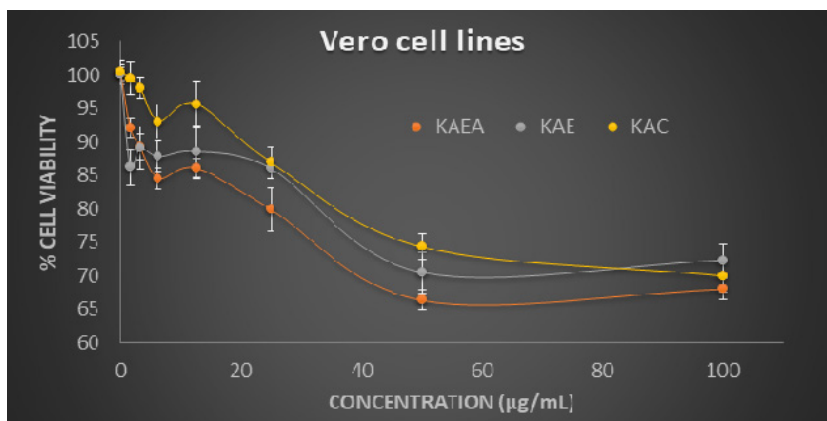


Рис. 4. Цитотоксична активність екстрактів *Kappaphycus alvarezii* щодо ліній нормальних клітин (Vero) та клітин раку ротової порожнини (KB 3-1)

Таблиця 6. Показники IC_{50} при дії екстрактів *Kappaphycus alvarezii* на лінії нормальних клітин (Vero) та клітин раку ротової порожнини (KB 3-1)

Екстракт	IC_{50} мкг/мл для ліній клітин	
	Vero	KB-3-1
KAE	$178,87 \pm 1,12$	$209,010 \pm 2,1$
KAEA	$151,95 \pm 2,45$	$106,705 \pm 4,1$
KAC	$149,48 \pm 2,01^{ns}$	$156,074 \pm 1,9$

KAE – етанольний екстракт *K. alvarezii*, KAEA – етилацетатний, KAC – хлороформний. Дані виражені як половина інгібуючої концентрації (IC_{50}). Кожна точка виражається як середнє $\pm$ стандартне відхилення у трьох повторностях. ANOVA, потім ANOVA, потім тест Тьюкі. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns – несуттєві.

На основі отриманих результатів проведено порівняльний аналіз біоактивності екстрактів *K. alvarezii* для застосування при захворюваннях порожнини рота. Їх було ранжировано за зростанням (табл. 7). Екстракт КАЕА виявився більш ефективним, ніж КАЕ та КАС.

Таблиця 7. Ранжування біоактивності екстрактів *Carpathicus alvarezii* щодо патогенів

№	Біологічна активність	КАЕ	КАЕА	КАС
1	Загальний вміст фенолу (TPC)	1	2	3
2	Загальний вміст флавоноїдів (TFC)	1	1	2
Протиоксидантна активність				
3	DPPH	3	1	2
4	NO	2	1	3
5	SO	3	1	2
6	H ₂ O ₂	2	1	3
Протимікробна активність				
7	Грам негативні бактерії	3	1	2
8	Грам позитивні бактерії	3	2	1
9	Гриби	3	2	1
10	Безпека нормальних клітин (життєздатність клітин Vero)	1	2	3
11	Чутливість до клітин раку ротової порожнини (цитотоксичність щодо клітин KB)	3	1	2

Обговорення

Морські водорості – це автотрофні організми, які містять широкий спектр біоактивних молекул, таких як алкалоїди, ліпіди, стерини, хініни, пептиди, полісахариди, дитерпеноїди, флоротаніни, полікетиди, гліцерини та феноли. Окрім антиоксидантів виявлені різні фенольні сполуки, що мають значну фармакологічну активність (West, Crawford, 2016; Zhou et al., 2017). Морські червоні водорості також можна віднести до категорії організмів, що мають багато фітохімічних властивостей (Shameel et al., 2013). Результати дослідження екстрактів *K. alvarezii* показали його ефективність

in vitro проти захворювань порожнини рота. Всі екстракти *K. alvarezii* показали хорошу протиксидантну активність та потенційну ефективність щодо патогенних мікроорганізмів ротової порожнини. Це може бути пов'язано з високим вмістом флавоноїдів та фенольних сполук.

Відомо, що феноли виявляють потужну протизапальну, протиксидантну активність, що робить їх важливими терапевтичними засобами при захворюваннях порожнини рота (Cory et al., 2018). Загальний вміст фенолів (TPC) в екстрактах *K. alvarezii* становив 26,8–27,2 мг GAE/г. Флавоноїди – це підгрупи фенольних сполук, що мають протигрибкову та протибактеріальну дію (Seleem et al., 2017). Загальний вміст флавоноїдів (TFC) порівняно вищий у КАЕА ($0,269 \pm 0,04$ мг QE/г), ніж у КАС ($0,222 \pm 0,01$ мг QE/г). Раніше повідомлялося про високий вміст флавоноїдів у водних та етилацетатних екстрактах (Lalopua et al., 2011; Kanatt et al., 2016) і що флавоноїди морських водоростей мають різну біологічну активність, включаючи гасіння вільних радикалів (Munir et al., 2013). GC-MS-аналіз КАЕА дозволив виявити наявність низки сполук (аланін, 3-антранілоїл-, метиловий ефір, 2-фуранкарбонової кислоти 3-тетрадециловий ефір, октадеканову кислоту, ізобутил-пропан-1,3-дііл-дикарбонат, фталевої кислоти дециловий 3,5-диметилфеніловий ефір, циклобутанацетонітрил, 1-метил-2-(1-метил-етенил), 2R, 3S, 4S)-3,4-епокси-2-фенілтіооктановий ізомер), які мають потужну активність при лікуванні різних розладів, включаючи захворювання порожнини рота.

Встановлено, що етилацетат є кращим розчинником для вилучення дитерпеноїдів, які є середньополярними сполуками (рис. 1). Дитерпени пригнічують ріст ротових бактерій, відповідальних за такі патології, як ендодонтичні інфекції та карієс зубів (Veneziani et al., 2017). Фітосполуки із родзинок, такі як тритерпени, жирні кислоти, амінокислоти, флавоноїди, олеанолова кислота, 5-(гідроксиметил)-2-фурфура, 5-гідроксиметил-2-фуральдегід, олеаноловий альдегід, зупиняють ріст біоплівки, утвореної *Porphyromonas gingivalis*, пародонтопатоген червоного комплексу (Chinsembu, 2016). Децил 3, 5-диметилфеніловий ефір фталевої кислоти, похідний дитерпенів, який виявлено нами в екстракті КАЕА, за даними Beulah et al. (2018), може мати протибактеріальну активність. Він також використовується для покриття деяких пероральних препаратів (Lara et al., 2017; Rasmussen et al., 2017). 2-фуранкарбонової кислоти 3-тетрадециловий ефір також використовується як фунгіцид та бактерицид. Серед виявлених сполук октадеканова (або стеаринова) кислота має протизапальні, протиракові, протигістамінні та протиекземічні властивості, широко використовується в стоматології та косметології (Yamuna et al., 2017). Pramitha et al. (2016) встановили, що етилацетатна фракція морської водорості *Sargassum wightii* містить октадецену кислоту.

Протиоксидантна активність – це здатність запобігати або затримувати руйнівні ефекти, спричинені вільними радикалами. Деякі комерційно доступні антиоксиданти (бутильований гідроксиланізол (ВНА), аскорбат, α -токоферол, пропілгалат) хімічно синтезуються і можуть викликати побічні ефекти, зокрема пошкодження печінки. Це змушує дослідників до активного пошуку нових антиоксидантів з природних джерел. Морські водорості є багатим джерелом таких сполук, все ще недостатньо досліджених. Вільні радикали значною мірою утворюються у морських водоростях, що зазнають дії світла та кисню як фотосинтезуючі організми. Це, в свою чергу, стимулює синтез багатьох протиоксидантних метаболітів для подолання пошкоджень внаслідок окислення (Chaula et al., 2019). Triphati et al. (2019) повідомляють про використання лікопену з морських водоростей – каротиноїдного пігменту з протиоксидантною властивістю, в десять разів більшою, ніж мають альфа-токоферол, сечова кислота та екстракт зеленого чаю, які є активними сполуками у боротьбі із запаленням ясен. Окислювальний стрес викликає різні захворювання порожнини рота, такі як підслизовий фіброз порожнини рота, лейкоплакія та рак порожнини рота.

Антиоксиданти з природних джерел, такі як вітамін С, селен, цинк, β -каротин, лікопін, куркумін, епігаллотехін-3-галлат, катехіни, мають терапевтичний ефект при лікуванні раку порожнини рота, кандидозу ротової порожнини, пародонтозу та гінгівіту (Vyas et al., 2018). Ці речовини допомагають стримати активність вільнорадикальних або реактивних форм кисню, полегшуючи запалення тканин ясен (San et al., 2011). Протиоксидантна активність морських водоростей залежить від кількості та положення гідроксильної групи на ароматичному кільці (Zolotareva et al., 2019). Всі екстракти *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС), що містять потужні фітосполуки, виявляли вищу протиоксидантну активність порівняно зі стандартом – аскорбіновою кислотою.

Також встановлено, що екстракт на основі етилацетату (КАЕА) має кращу протиоксидантну, протимікробну та цитотоксичну активність, ніж хлороформний (КАС) та етанольний (КАЕ) екстракти. Попередні дослідження *K. alvarezii* (Sumayya, Murugan, 2017) показали подібну протиоксидантну активність.

Ротова порожнина має безліч патогенних та непатогенних аеробних та анаеробних мікробів. Хвороби ротової порожнини, включаючи карієс зубів, пародонтоз, гінгівіт, молочницю ротової порожнини та виразковий гінгівіт, виникають через велике скупчення патогенних мікробів. Ці мікроби продукують прозапальні цитокіни, що призводить до набряків, кровотечі, ерозії ясен, поглиблення дірок у зубах та їх втрату. Ротові мікроби також відповідають за інші хронічні розлади, такі як аутоімунні і серцево-судинні захворювання, ревматоїдний артрит (Sharan, Vennila,

2019). *Staphylococcus aureus* – це грампозитивні інфекційні бактерії, що містяться у ротовій порожнині та верхніх дихальних шляхах. *Bacillus subtilis* також міститься у шлунково-кишковому тракті людини. *Escherchia coli* знаходиться в кишечнику і викликає діарею через заражену їжу та воду. *Pseudomonas aeruginosa* викликає інфекції сечовивідних шляхів та шлунково-кишкового тракту. *Klebsiella pneumoniae* – кишкова бактерія, яка може спричинити інфекції, якщо вона поширюється в кров або дихальні шляхи. Відомо, що *Candida albicans* викликає інфекції у людей, включаючи кандидоз порожнини рота. Повідомлялося про присутність в ротовій системі численних аеробних мікробів, що належать до родів *Streptococcus* і *Staphylococcus*, *C. albicans* та *E. coli* (Daniluk et al., 2006). В останні роки дослідники активно вивчали біоактивні сполуки, отримані з морських водоростей, і досліджували їх терапевтичну активність проти патогенних мікробів (El Gamal, 2011).

Наші дослідження показали, що екстракти *K. alvarezii* (КАЕ, КАЕА та КАС) виявляють протимікробну активність проти згаданих вище грибів та бактерій. КАЕА виявився ефективнішим, ніж *Bacillus subtilis* і *Klebsiella pneumoniae*, а КАС ефективнішим за *B. subtilis* та *C. albicans*. Протимікробна активність усіх екстрактів для *S. aureus* була однаковою. У попередньому дослідженні (Jennifer et al., 2015) висловлювалося припущення, що протимікробна активність екстрактів *K. alvarezii* може бути пов'язана з наявністю в них фітосполук, таких як хініни та феноли. Seetharaman et al. (2016) повідомляли про подібну протибактеріальну активність метанольного екстракту *K. alvarezii* щодо *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *P. vulgaris*.

Встановлено, що екстракти *K. alvarezii* є безпечними щодо життєздатності клітин та цитотоксичної дії на нормальні клітини. КАЕ мав найвищий відсоток життєздатності клітин у нормальних клітинах Vero (IC_{50} мкг/мл: $178,87 \pm 0,112$), за ним КАЕА (IC_{50} мкг/мл: $151,95 \pm 0,123$) та КАС (IC_{50} мкг/мл: $149,48 \pm 0,322$). Ці значення IC_{50} були вищими за значення стандартного препарату цисплатин (хіміотерапевтичний препарат для лікування запущеного плоскоклітинного раку ротової порожнини) у клітинах Vero (76,69 мкг/мл; Andreadis et al., 2003), які визнані безпечними для нормальних клітин. Тому було рекомендовано тривале вживання екстракту *K. alvarezii* для підвищення протиоксидантного потенціалу та захисту від перекисного окислення ліпідів тканин та пошкодження клітин (Nagarani, Kumaraguru, 2012).

Екстракти *K. alvarezii* викликали дуже слабе пригнічення росту клітин раку ротової порожнини (клітинні лінії KB-3-1). Про цей низький цитотоксичний ефект свідчать вищі значення IC_{50} (КАЕА: $106705 \pm 0,41$ мкг/мл, КАС: $156,074 \pm 0,19$ мкг/мл і КАЕ: $209 \pm 0,21$ мкг/мл) порівняно з дією цисплатину у клітинах KB-3-1 (6,90 мкг/мл) (Campos et

al., 2017). Інші автори також відмічали низький цитотоксичний ефект екстрактів *K. alvarezii* на інші лінії клітин раку, такі як лінія раку шийки матки HeLa (Lau et al., 2014) та лінія клітин гепатоми HepG2 (Ariffin et al., 2014). Однак за іншими даними (Chang et al., 2017), екстракти *K. alvarezii* викликали зменшення росту клітин MCF-7 (клітинна лінія раку молочної залози) з 84,91 до 0,81%, а значення IC₅₀ становило 4,1 ± 0,69 мг/мл. При дослідженні очищеного полісахариду каппа-каррагінан, отриманого з *K. alvarezii*, також було виявлено протиракову активність стосовно B16F10 (клітинна лінія раку меланоми) та 4T1 (клітинна лінія раку молочної залози), що несуть моделі мишей-ксенотрансплантатів (Kiruba et al., 2018). Ці результати свідчать про те, що, хоча екстракти *K. alvarezii* не ефективні для інгібування росту клітин раку порожнини рота, вони можуть бути ефективними при інших видах раку, таких як рак молочної залози. Подальші цитотоксичні дослідження з очищеною фракцією активних сполук з екстрактів *K. alvarezii* доможуть прояснити питання пригнічення швидкості росту ракових клітин.

Висновки

Отримані результати досліджень свідчать про можливість застосування екстрактів червоної водорості *Kappaphycus alvarezii* при захворюваннях порожнини рота. Використання фітосполук *K. alvarezii* при виробництві стоматологічних товарів, таких як гелі для порожнини рота, освіжувач дихання, рідин для полоскання рота, зубна паста, а також продуктів харчування та напоїв, допоможе підтримати здоров'я зубів споживачів цих продуктів. Але для підтвердження цих фактів потрібні ще дослідження *in vivo*. Хоча в стоматологічних програмах використовується обмежений набір речовин з морських водоростей, необхідно покращувати режим подальшого контролю та проводити відповідні дослідження для стандартизації доступності *K. alvarezii* у стоматологічних продуктах та вивчення його ефектів.

Список літератури

- Akwu N.A., Naidoo Y., Singh M., Nundkumar N., Lin J. 2019. Phytochemical screening, *in vitro* evaluation of the antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potentials of *Grewia lasiocarpa* E.Mey. ex Harv. *South Afr. J. Bot.* 123: 180–192.
- Andreadis C., Vahtsevanos K., Sidiras T., Thomaidis I., Antoniadis K., Mouratidou D. 2003. 5-Fluorouracil and cisplatin in the treatment of advanced oral cancer. *Oral Oncol.* 39: 380–385.
- Ariffin F.D., Abdullah A., Meng C.K., Ariffin S.H., Sahani M. 2014. Cytotoxic effect of red seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* on hepatocarcinoma HepG2 cell line. *Adv. Environ. Biol.* 8(15): 79–84.

- Balasubramaniam V., Mustar S., Mustafa K.N., Abd R.A., Mohd N.M.F., Wilcox M.D., Chater P.I., Brownlee I.A., Pearson J.P. 2013. Inhibitory activities of three Malaysian edible seaweeds on lipase and α -amylase. *J. Appl. Phycol.* 25: 1405–1412.
- Banu K., Cathrine L. 2015. General techniques involved in phytochemical analysis. *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* 2: 25–32.
- Beulah G.G.P., Tresina Soris P., Mohan V.R. 2018. GC-MS Determination of Bioactive Compounds of *Dendrophthoe falcata* (L.F) Ettingsh: An Epiphytic Plant. *Int J Health Sci Res.* 8: 261–269.
- Campos F.F., Ramos J.P., De Oliveira D.M., Alves T.M., De Souza-Fagundes E.M., Zani C.L., Sampaio F.C., Converti A., Cota B.B. 2017. *In vitro* leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochlioquinone A obtained from the fungus *Cochliobolus* sp., *J. Biosci.* 42(4): 657–664.
- Chang V.S., Okechukwu P.N., Teo S., Sen. 2017. The properties of red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) and its effect on mammary carcinogenesis. *Biomed. Pharm.* 87: 296–301.
- Chaula D., Laswai H., Chove B., Dalsgaard A., Mdegela R., Jacobsen C., Hyldig G. 2019. Effect of clove (*Syzygium aromaticum*) and seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) water extracts pretreatment on lipid oxidation in sun-dried sardines (*Rastrineobola argentea*) from Lake Victoria, Tanzania. *Food Sci. Nutr.* 7: 1406–1416.
- Cherian C., Vennila J.J., Sharan L. 2019. Marine bromophenols as an effective inhibitor of virulent proteins (peptidyl arginine deiminase, gingipain R and hemagglutinin A) in *Porphyromonas gingivalis*, *Arch. Oral Biol.* 100: 119–128.
- Chinsembu K.C. 2016. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Trop.* 154: 6–18.
- Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M., Mattei J. 2018. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* 5: 1–9.
- Cyriac B., Eswaran K. 2016. Anti- hyperglycemic effect of aqueous extract of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) doty ex. p. silva in alloxan-induced diabetic rats. *J. Appl. Phycol.* 28: 2507–2513.
- Dai Chun-Ling, Yong-Ju, Liang, Yan-Sheng Wang, Amit K.T., Yan-Yan Yan, Fang Wang, Zhe-Sheng Chen, Xiu-Zhen Tong, Li-Wu Fu. 2009. Sensitization of ABCG2-overexpressing cells to conventional chemotherapeutic agent by sunitinib was associated with inhibiting the function of ABCG2. *Cancer letters.* 279: 74–83.
- Daniluk T., Tokajuk G., Cylwik-Rokicka D., Rozkiewicz D., Zaremba M.L., Stokowska W. 2006. Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. *Adv. Med. Sci.* 51: 81–85.
- El Gamal A.A. 2011. Biological Importance of Marine Algae. *Handbook of Marine Macroalgae. Saudi Pharm. J.* 18: 1–35.
- Elkady A.I., Ramadan W.S. 2016. The aqueous extract of cinnamon bark ameliorated cisplatin-induced cytotoxicity in vero cells without compromising the anticancer efficiency of cisplatin. *Biomed. Papers J. Palacký Univ. Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic.* 160: 363–371.

- Ganesh S., Vennila J.J. 2011. Phytochemical analysis of *Acanthus ilicifolius* and *Avicennia officinalis* by GC-MS. *Res. J. Phytochem.* 5(1): 60–65.
- Godha S., Dasar P.L., Sandesh N., Mishra P., Kumar S., Balsaraf S., Bhadauria U.S., Vyas S. 2015. Oral Health: A Window to your Overall Health. *Int. J. Oral Health Med. Res.* 2: 105–108.
- Jennifer N., Kiruba M., Pradeep M.A., Jemima S., Juliana B. 2015. Study of Phytoconstituents and antibacterial activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Int. J. Cur. Microbiol. App. Sci.* 4: 1209–1217.
- Kanatt S.R., Lahare P., Chawla S.P., Sharma A. 2016. *Kappaphycus alvarezii*: Its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 5: 1–6.
- Kiruba N.J., Pradeep M.A., Thatheyus A.J. 2018. Discovering Promising Anti-cancer Drug Candidates from Marine Algae. *Sci. Int.* 6(2): 44–50.
- Kumar U.S., Jothy S.L., Kavitha N., Chen Y., Kanwar J.R., Sasidharan S. 2018. Genoprotection and Cytotoxicity of *Cassia surattensis* Seed Extract on Vero Cell Evaluated by Comet and Cytotoxicity Assays. *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B: Biol. Sci.* 88: 313–320.
- Lalopua V.P., Purnomo H., Sukoso, Aulani'am. 2011. Red seaweed (*Kappaphycus alvarezii* DOTY) from Mollucas island water as potential flavonoid resource of natural antioxidant, *Livest. Res. Rural Dev.* 23: 254.
- Lara N.L., van den Driesche S., Macpherson S., França L.R., Sharpe R.M. 2017. Dibutyl phthalate induced testicular dysgenesis originates after seminiferous cord formation in rats. *Sci. Rep.* 7(1): 1–3.
- Lau T.Y., Vittal D.F., Chew C.S.Y., Yong W.T.L. 2014. Antiproliferative Potential of Extracts from *Kappaphycus* Seaweeds on HeLa Cancer Cell Lines. *Sains Malays.* 43: 1895–1900.
- Ling A.L.M., Yasir S., Matanjun P., Abu Bakar M.F. 2015. Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. *J. Appl. Phycol.* 27: 1717–1723.
- Miazek K., Kratky L., Sulc R., Jirout T., Aguedo M., Richel A., Goffin D. 2017. Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 18(7): 1429.
- Muhaidat R., Al-Qudah M.A., Samir O., Jacob J.H., Hussein E., Al-Tarawneh I.N., Bsoul E., Abu Orabi S.T. 2015. Phytochemical investigation and in vitro antibacterial activity of essential oils from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Delile and *C. trinervia* Fresen. (*Cleomaceae*). *South Afr. J. Bot.* 99: 21–28.
- Munir N., Sharif N., Naz S., Farkhanda M. 2013. Algae: A potent antioxidant source. *Sky J. Microbiol. Res.* 1: 22–31.
- Nagarani N., Kumaraguru A.K. 2012. Investigation of the effect of *K. alvarezii* on antioxidant enzymes, cell viability and DNA damage in male rats. *Front Life Sci.* 6: 97–105.
- Pradeep C.K., Channarayapatna-Ramesh S., Kujur S., Basavaraj G.L., Madhusudhan M.C., Udayashankar A.C. 2018. Evaluation of in vitro Antioxidant Potential of *Phyllanthus acidus* Fruit. *Res. J. Life Sci., Bioinfo., Pharm. and Chem. Sci.* 4: 30–41.

- Pramitha V.S., Sree Kumari N. 2016. Anti-inflammatory, antioxidant, phytochemical and GC-MS analysis of marine brown macroalga, *Sargassum wightii*. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* 6(1): 7–15.
- Rajesh K.D., Vasanth S., Panneerselvam A., Valsala R.N., Jeyathilakan N. 2016. Phytochemical Analysis, *in vitro* Antioxidant Potential and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Studies of *Dicranopteris Linearis*, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 9(2): 1–6.
- Ramamoorthy S., Gnanakan A., Lakshmana S., Meivelu M., Jeganathan A. 2018. Structural characterization and anticancer activity of extracellular polysaccharides from ascidian symbiotic bacterium *Bacillus thuringiensis*, *Carbohydr. Polym.* 190: 113–120.
- Rasmussen L.M., Sen N., Vera J.C., Liu X., Craig Z.R. 2017. Effects of *in vitro* exposure to dibutyl phthalate, mono-butyl phthalate, and acetyl tributyl citrate on ovarian antral follicle growth and viability. *Biol. Reprod.* 96(5): 1105–1117.
- San S.M., Opperman L.A., Allen E.P., Svoboda K.K. 2011. Use of antioxidants in oral healthcare. *Compendium of continuing education in dentistry* (Jamesburg, NJ: 1995). 32(9): E156–159.
- Seetharaman S., Indra V., Selva Muthu B., Daisy A., Geetha S. 2016. Phytochemical profiling and Antibacterial potential of *Kappaphycus alvarezii* methanol extract against clinical isolated bacteria. *World J. Pharm. Pharmacol. Sci.* 5(6): 1328–1337.
- Seleem D., Pardi V., Murata R.M. 2017. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-Candida albicans activity *in vitro*. *Arch. Oral Biol.* 76: 76–83.
- Shameel M., Afaq-Husain S., Zarina A. 2013. Phycochemical studies on seven species of *Rhodophycota* from Karachi coast of Pakistan. *Int. J. Algae.* 15(3): 285–290.
- Sharan L., Vennila J. 2019. Marine algae as a promising natural resource in treating Periodontitis: Current status and applications. *Res. J. Biotechnol.* 14: 71–82.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–178.
- Sumayya S., Murugan K. 2017. Phytochemical screening, RP-HPLC and FTIR Analysis of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C.Silva: Macro red algae. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 6: 325–330.
- Sumayya S., Murugan K. 2018. Fractionation of purified terpenoids from red algae *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V.Lamouroux. and *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva. By Gc: Ms analysis. *J. Pharm. Phytochem.* 7: 636–640.
- Tripathi P., Vikram B., Preeti U., Manika J., Shweta G., Sadaf N. 2019. Antioxidant therapy (lycopene and green tea extract) in periodontal disease: A promising paradigm, *J. Indian Soc. Periodontol.* 23: 25.
- Veneziani R.C.S., Ambrósio S.R., Martins C.H.G., Lemes D.C., Oliveira L.C. 2017. Chap. 4 – Antibacterial Potential of Diterpenoids. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 54: 109–139.
- Vyas T., Sood P., Kaur M. 2018. Antioxidants in Oral Diseases and Future Prospects and their Application in Dentistry. *J. Adv. Med. Dent. Sci. Res.* 6: 53–62.

- West K., Crawford A. 2016. Marine Bio discovery Goes Deeper: Using In. Vivo Bioassays Based on Model Organisms to Identify Biomedically Relevant Marine Metabolites. *Planta Med.* 82: 754–760.
- Yamuna P., Abirami P., Vijayashalini P., Sharmila M. 2017. GC-MS analysis of bioactive compounds in the entire plant parts of ethanolic extract of *Gomphrena decumbens* Jacq. *J. Med. Plants Stud.* 5(3): 31–37.
- Zhou Y., Zhang W., Liu X., Yu H., Lu X., Jiao B. 2017. Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatase 1B from Marine Natural Products. *Chem. Biodivers.* 14: e1600462.
- Zolotareva E.K., Mokrosnop V.M., Stepanov S.S. 2019. Polyphenol Compounds of Macroscopic and Microscopic Algae. *Int. J. Algae.* 21(1): 5–24.
<https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v21.i1.10>

Підписав до друку С.Шалигін

Sharan L.V., Vennila J.J. 2021. **Phyto-pharmacological investigation of algae *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva for oral diseases (*Rhodophyta*).** *Algologia.* 31(2): 170–199

Department of Department of Biotechnology, School of Agriculture and Biosciences,
 Karunya Institute of Technology & Sciences (Deemed University), Coimbatore, India

Oral infections (gingivitis and periodontitis) and oral cancer are under rise in developing countries. Products with antibacterial and antioxidant activity can provide a combined approach to treat oral disorders. Marine algae is a reservoir of rich bioactive phytochemicals and are considered to be potential candidates in natural pharmaceuticals. *Kappaphycus alvarezii* is a marine algae widely cultivated for food applications. The current study investigates the phyto-pharmacological properties of *K. alvarezii* for oral diseases. Different polarity solvents (ethanol, ethyl acetate and chloroform) were used in the extraction of bioactive components of *K. alvarezii*, partially characterized by GCMS and studied for their antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity. All the *K. alvarezii* extracts exhibited good antioxidant activity and potential efficacy against oral pathogenic microbes. Although *K. alvarezii* extracts were found to be safe for normal Vero cells, their inhibitory activity on oral cancer cells (KB-3-1 cell lines) was found to be low. These findings have suggested the possibility of *K. alvarezii* using in the dental preparation/product to combat oral infections.

Key words: *Kappaphycus alvarezii*, marine algae, oral disease, dental applications, periodontitis, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity

Пам'яті колеги

СТРЕЛЬНИКОВА НІНА ІВАНІВНА
(28.05.1933 – 07.12.2020)

Європейська діатомологія втратила видатного вченого. Сьомого грудня 2020 р. в Санкт-Петербурзі померла Ніна Іванівна Стрельнікова – доктор біологічних наук, професор Санкт-Петербурзького університету, альголог, ботанік, спеціаліст з викопних і сучасних діатомових водоростей.



Ніна Іванівна народилася 28 травня 1933 р. у сім'ї біологів. Її батько, Іван Дмитрович Стрельніков, був професором зоології, засновником експериментальної екології, творцем найбільшої еколого-фізіологічної школи в СРСР, мати, Олександра Павлівна, – доцентом факультету ботаніки Ленінградського університету. Все життя Ніни Іванівни було пов'язане з біолого-грунтовим (біологічним) факультетом Ленінградського (нині Санкт-Петербурзького) університету.

До 1941 р. сім'я Стрельнікових жила в Старому Петергофі, мальовничому передмісті Ленінграда. На початку війни, у вересні 1941 р., восьмирічну Ніну з п'ятьма її ровесниками евакуювали з блокадного Ленінграда до Ярославської області.

У 1951 р. Ніна Стрельнікова вступила до Ленінградського державного університету ім. А.О. Жданова на біологічний факультет. Будучи

студенткою, вона особливо любила польові роботи. Першу практику провела на Мурманській біологічній станції в Баренцевому морі, а влітку 1953 р. працювала з діатомологом А.І. Прошкіною-Лавренко на березі Азовського моря. У зв'язку з інтенсивними пошуками нафти і газу та успішним використанням мікрофосилій як біостратиграфічних маркерів 1950–1960-ті роки стали часом розквіту «методу діатомового аналізу» в Радянському Союзі. Вже з 1953 р. Н.І. Стрельнікова почала вивчати діатомові водорості під керівництвом професора В.С. Шешукової-Процюк. У 1954 р. Ніна Іванівна брала участь у своїй першій геологічній експедиції на східних схилах Північного Уралу. З того часу викопні діатомей крейдового та палеогенового періодів стали об'єктом її досліджень, а матеріали, зібрані в цій та інших експедиціях, лягли в основу її кандидатської дисертації.

Працюючи в 1956–1971 рр. у палеологічній лабораторії (Геолого-розвідувальний інститут), Н.І. Стрельнікова привозила крейдові та палеогенові діатоміти із Західного та Східного Сибіру, Сахаліну, Курильських островів, Середньої Азії, басейну річки Коліми. В 1969 р. на науково-дослідному судні «Витязь» вона три місяці вивчала фітопланктон у північній частині Тихого океану. Привезені нею матеріали істотно поповнили багату колекцію викопних зразків, зібрану відомими діатомологами кафедри ботаніки Санкт-Петербурзького університету з усього світу. Ця колекція є унікальним джерелом даних з різноманітності та еволюції діатомових водоростей. Деякі з цих зразків в останні роки були депоновані в Музей природної історії в Лондоні і в Каліфорнійську академію наук у Сан-Франциско.

В 1966 р. Н.І. Стрельнікова захистила кандидатську дисертацію під назвою «Пізньокрейдові діатомові водорості півночі Західно-Сибірської низовини». З 1971 р. вона викладала на кафедрі ботаніки Ленінградського державного університету ім. А.О. Жданова, читала низку курсів для студентів і аспірантів, серед них «Нижчі рослини», «Палеоальгологія», спецкурси «Макрофіти морів», «Основи географії водоростей і грибів», «Основи екології водоростей», «Історія діатомової флори», «Географія водоростей» і продовжувала дослідження древніх діатомей. Кафедра ботаніки університету була відома як «діатомовий куточок» – неформальний центр досліджень діатомових водоростей, місце, де працювали відомі фахівці і колеги з різних країн, які приїздили, щоб отримати консультацію, ознайомитися з літературою, поділитися досвідом.

У 1974 р. вийшла монографія Н.І. Стрельнікової «Діатомей пізньої крейди», перше велике зведення про діатомей цього часового періоду.

У 1976–1977 рр. Н.І. Стрельнікова брала участь в обробці матеріалів 38-го рейсу глибоководного буріння б/с «Гломар Челленджер» у Норвезькому морі. Результати опубліковані в працях проекту (1976) і

монографії «Історія мікропланктону Норвезького моря (за матеріалами глибоководного буріння)» (1979).

Стрельнікова Н.І. захистила докторську дисертацію під назвою «Палеогенові діатомові водорості високих широт Північної і Південної півкуль» у 1987 р., а в 1992 р. на основі матеріалів дисертації опублікувала монографію «Палеогенові діатомові водорості», до якої увійшли також деякі дані щодо діатомей українських розрізів.

З 1974 р. Н.І. Стрельнікова брала участь у підготовці першого тому багатотомного видання «Діатомові водорості СРСР. Викопні і сучасні», була автором одного з розділів. У 1992, 2002 і 2008 рр. – у підготовці продовження цього видання під назвою «Діатомові водорості Росії і суміжних країн. Викопні і сучасні» (вип. 3, 2002 і вип. 5, 2008, видавництво СПбДУ). Це видання не має аналогів у міжнародній літературі з діатомових водоростей, оскільки включає матеріали досліджень про сучасні та викопні таксони діатомей.

Вона стояла біля витоків організації наукових діатомових шкіл, які зіграли важливу роль у розвитку діатомового аналізу в багатьох республіках колишнього СРСР і в об'єднанні фахівців, допомагаючи становленню молодих учених, які присвятили себе вивченню діатомей.

Ніна Іванівна Стрельнікова широко відома у вітчизняних і міжнародних наукових колах. Будучи членом Міжнародного діатомового товариства (International Society for Diatom Research), брала участь у роботі Міжнародних діатомових симпозіумів, вела спільні дослідження із зарубіжними колегами на тему «Міжнародна програма геологічної кореляції», а в 1998–2005 рр. співпрацювала з Каліфорнійською академією наук, обробляючи колекції діатомей.

Вона є автором понад 120 наукових робіт, більшість з яких присвячена різноманітності палеогенових і крейдових діатомових водоростей. Описала 11 родів діатомових і 63 нових для науки види, встановила 63 нові комбінації. На її честь названо три роди та дев'ять видів.

До 80-річчя Ніни Іванівни був виданий спеціальний випуск додатку до журналу *Nova Hedwigia* (Diatom research..., 2014). Це видання включає 27 статей, у написанні яких взяли участь понад 50 вчених з 14 країн. Одна з її колишніх учениць, професор Марина Потапова, підготувала огляд історії життя знаної вченої – «Вісімдесят років життя», доповнений фотографіями. В ньому представлені публікації Ніни Стрельнікової та описані нею нові роди й види, а також такі, що названі на її честь.

Пам'ять про Ніну Іванівну Стрельнікову – ерудованого професора, фахівця з систематики, еволюції, екології, біостратиграфії діатомових водоростей і чудову людину збережуть її чисельні колеги, друзі та колишні учні.

Таксони, названі на честь Н.І. Стрельнікової:

- Caloneis strelnikovae* Z.Levkov & D.M.Williams 2014
Pantocsekiella strelnikovae (S.I.Genkal & Yarushina) K.Y.Kiss, S.I.Genkal & E.Ács 2016
Didymosphenia strelnikovae Metzeltin, Lange-Bertalot & Kulikovskiy 2014
Fragilaria strelnikovae Genkal & Yarushina 2018
Gomphonella strelnikovae (Kociolek & Kulikovskiy) R.Jahn & N.Abarca 2019
Navicula strelnikovae Kulikovskiy, Lange-Bertalot & Metzeltin 2012
Nitzschia strelnikovae Lange-Bertalot 2005
Platessa strelnikovae M.D.Enache, M.Potapova & E.A.Morales 2014
Psammothidium strelnikovae M.Potapova 2014
Stauroneis strelnikovae Lange-Bertalot & Van de Vijver 2004
Thalassiosira strelnikovae I.V.Makarova, Kulikovskiy, J.Witkowski, D.M.Harwood (Eds)
Nova Hedwigia. 2014. Beih. 143. 518 p.

О.П. Ольштинська

Інститут геологічних наук НАН України, Київ
ol-lesia@ukr.net

Енциклопедія Куяльницького лиману: у 8 т./гол. ред. А.А.-А. Еннан; видавнича рада: Б.Є. Патон (голова), С.Р. Гриневецький (заст. голови), А.А.-А. Еннан [та ін.]; ФХІЗНСІЛ МОН і НАН України. Одеса, 2018-ISBN 978-617-7366-33-0 (Освіта України). Т. 2: Водорості/Герасимюк В.П., Еннан А.А.-А., Шихалєєва Г.М.; відп. ред. П.М. Царенко, А.А.-А. Еннан; ред. кол. Д.В. Дубина, А.А.-А. Еннан, П.Д. Клоченко [та ін.]. ФХІЗНСІЛ МОН і НАН України. Одеса: Астропринт, 2020. 448 с.: рис. 70, фото табл. 45, іл. 515.

ISBN 978-966-927-632-2

Узагальнююча фундаментальна монографія з альгофлори Куяльницького лиману (українського аналога Мертвого моря) ілюструє результати оригінальних системних багаторічних (2001–2018 рр.) досліджень різноманіття водоростей його басейну, акваторії та узбережжя, динаміки змін видового складу, таксономічної структури, залежності меж видової толерантності від абіотичних чинників на тлі періодичного осолонення водоймища за загальний 150-літній період вивчення (1867–2018 рр.). Представлено результати аналізу особливостей розподілу водоростей у басейні лиману та віддзеркалена специфіка видового складу цих організмів, проілюстровані характерні ценотичні та типологічні комплекси, оцінено багаторічні та сезонні сукцесії їхнього видового різноманіття, адаптаційні можливості окремих видів і провідних альгоугруповань за умов динамічної зміни гідролого-гідрохімічного режиму лиману. Сформовано зведений список водоростей басейну Куяльницького лиману та список нових і регіонально рідкісних таксонів його басейну, а також проілюстровано 153 види кольоровими та чорно-білими фотографіями.

Книга рекомендована для ботаніків, гідробіологів, екологів, викладачів та студентів вищу, вчителів шкіл, представників природоохоронних установ та підрозділів.

УДК 582.26:574.5(262.5.05)

ISBN 978-617-7366-33-0 (заг)

© Фізико-хімічний інститут захисту навколишнього середовища і людини МОН України та НАН України, 2020

ISBN 978-966-927-632-2 (Т. 2)

© Герасимюк В.П., Еннан А.А.-А., Шихалєєва Г.М., 2020