

ИЗУЧЕНИЕ симбиотического сообщества БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК С ПОМОЩЬЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ АКВАРИУМНЫХ УСТАНОВОК

Впервые на базе Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук создан и функционирует с июля 2009 года холодноводный «Пресноводный аквариумный комплекс» (ПАК) как Центр коллективного пользования. Он включает проточные и замкнутые аквариумные установки с регулированием факторов среды (температуры, светового режима, pH, содержания кислорода и др.). Его применение позволяет проводить эксперименты и наблюдения, неосуществимые в естественных условиях.

ПАК дает возможность для применения комплекса современных методов биохимического анализа (тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия) изучаемых объектов. Это позволяет эффективно, быстро, с высокой степенью чувствительности обнаруживать изменения биологически активных веществ в живых организмах и оценивать взаимодействия внутри сложных симбиотических сообществ, выявлять особенности их развития. ПАК позволяет также получать устойчивые аквакультуры отдельных компонентов сообщества, с оценкой их изменчивости. В статье приводятся результаты исследований с применением ПАК симбиотического сообщества байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1771) при инкубации её в течение 6 месяцев.

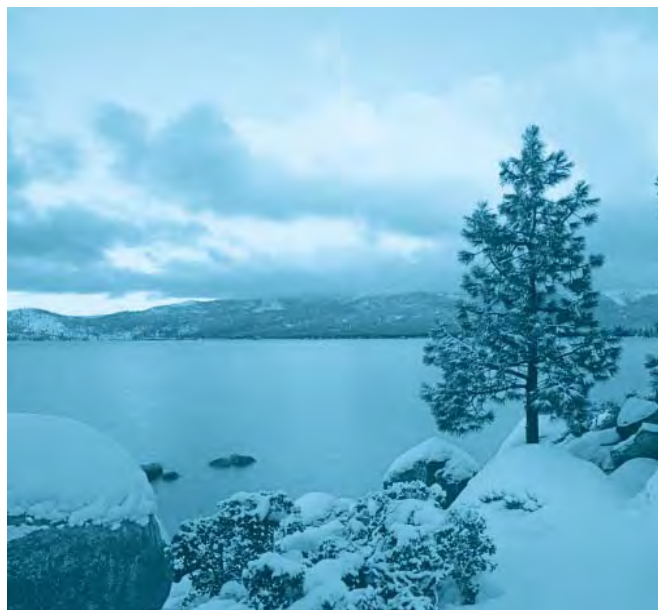
Введение

В настоящее время в мировой практике вопросы совершенствования методов искусственного разведения ценных гидробионтов выдвигаются на первый план. Острая необходимость повышения эффективности искусственного воспроизводства гидробионтов требует внесения существенных изменений в применяемую на предпри-

А.В. Глызин*,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Байкальского музея Иркутского научного центра Сибирского отделения РАН

О.Ю. Глызина,
кандидат биологических наук, руководитель ЦКП «Пресноводный аквариумный комплекс», старший научный сотрудник Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук

С.А. Любченко,
ведущий инженер Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук



ятиях биотехнологию выращивания живого материала на всех этапах цикла развития организма. При создании эффективных технологий выращивания объектов аквакультуры на интенсивной основе используют в основном эколого-морфологический подход. В этом аспекте научные разработки по культивированию байкальских гидробионтов, особенно беспозвоночных животных, отсутствуют, возможно, из-за сложности их содержания и культивирования в искусственных условиях. Это, в частности, привело к тому, что основной объем исследований биоты озера Байкал приходится на работы систематико-фаунистического направления. При этом аспекты экологии и биохимии байкальских гидробионтов остаются практически неизученными. Эколого-биохимические исследования гидробионтов озера Байкал также носят спорадический характер или выполнены по устаревшим методикам [1,2,3]. В настоящее время также существует

* Адрес для корреспонденции: Glizin@mail.ru

проблема длительного содержания сообщества байкальских губок в живых музейных экспозициях Байкальского музея ИНЦ СО РАН, даже с использованием проточных аквариумных систем.

С целью решения этой проблемы были созданы экспериментальные комплексы аквариумных установок на базе Байкальского музея ИНЦ СО РАН, являющихся частью естественного водоема (проточный водообмен с озером Байкал) и «Пресноводный аквариумный комплекс» (ПАК) на базе Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН). Технологическое решение общей конфигурации ПАК ЛИН СО РАН определялось наличием пользователей с разными интересами. Комплекс работает на основе модульного принципа. Каждый модуль представляет собой автономную независимую установку (блок). Решение основных технических и научно-методических вопросов основывается на следующих принципах:

- ♦ выбор оптимальных биотехнологических режимов аквариумного содержания гидробионтов;
- ♦ периодический контроль основных параметров природной байкальской и водопроводной воды;
- ♦ организация круглогодичного содержания и культивирования пресноводных организмов для обеспечения научного процесса ЛИН СО РАН и других институтов;
- ♦ периодического пополнения ПАК байкальской водой и гидробионтами из озера Байкал и его притоков.

В ПАК установлен комплект приборов, обеспечивающих авторегуляцию условий содержания гидробионтов и постоянное наблюдение за исследуемыми объектами при

Ключевые слова:

холодноводный
пресноводный
аквариумный
комплекс,
гидробионты,
озеро Байкал

непрерывных, длительных экспериментах (насосы, охлаждающие инкубаторы, циркулирующие термостаты и другое оборудование). При их использовании можно применять не только традиционные биологические методы, но и высокочувствительные биохимические методики для выявления биохимических взаимодействий, как между самими организмами, так и между ними и средой обитания.

С целью определения эффективности использования ПАК для изучения байкальских гидробионтов, отличающихся узкой экологической амплитудой первые исследования были проведены на примере древнейших среди водных беспозвоночных животных Байкала – губках.

Материалы и методы исследования

Объектом нашего исследования выбран наиболее массовый вид крупной ветвистой губки *Lubomirskia baicalensis* (Pallas, 1771), распространенной преимущественно в районе Южного и Среднего Байкала и образующий сложное симбиотическое сообщество.

Многочеточные губки – типичные фильтраторы, питающиеся органической взвесью, простейшими и бактериями. Недифференцированные клетки губок – архециты способны возобновляться и дифференцироваться в другие клетки животного. Архециты можно считать эмбриональными стволовыми клетками губок. В настоящее время наблюдается рост научных работ, посвященных культивированию морских губок [2,3], потому что среди гидробионтов именно губки продуцируют наибольшее количество

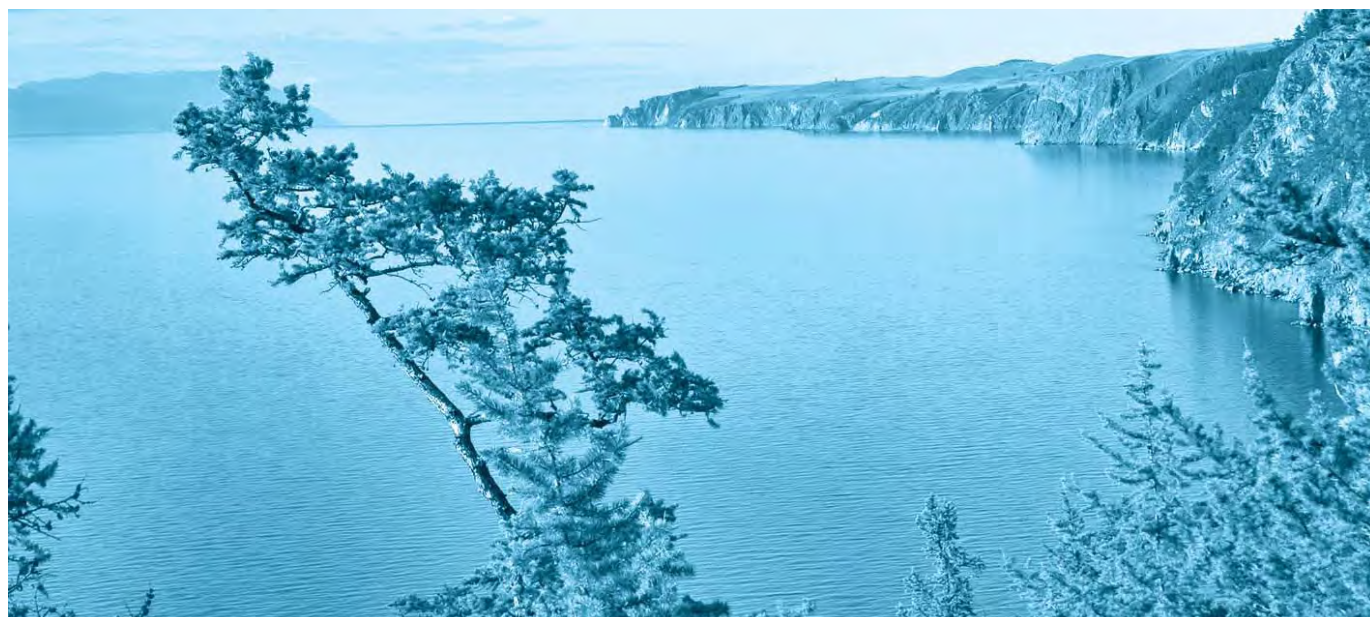


Таблица 1

Химический состав использованной при проведении экспериментов по инкубации губки байкальской природной и водопроводной воды г.Иркутска

Вода	Жесткость	рН	O ₂ (мг/л)	Si (мг/л)	Fe (мг/л)	Содержание ионов (мг/л)				
						NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	Mg ²⁺	NO ₃ ⁻	Cl ⁻
Байкальская	1,17	7,5	11,7	0,67	0,02	0,055	0,49	3,04	0,25	0,00
Водопроводная	1,05	7,1	3,5	1,0	0,1	0,004	0,03	3,01	0,25	0,32
Водопроводная после очистки	1,04	7,0	3,0	0,51	0,08	0,003	0,01	3,00	0,17	0,05

самых разнообразных биологически активных веществ.

Байкальские губки это сложные симбиотические сообщества включающие эндо- (микроводоросли, бактерии) и экзосимбионтов (амфиподы, моллюски, ручейники, олигохеты) [2]. Большинство организмов, входящих в симбиотическое сообщество, являются эндемиками озера Байкал. Все они тесно включены в физиологические процессы самой губки и определяют гетеро- или автотрофный способ её питания. Предыдущими исследованиями [4] было определено, что в сообществе байкальских губок существуют следующие трофические взаимодействия: водоросли → бактерии, губка → водоросли, губка → бактерии, бактерии → губка, водоросли → губка, которые хорошо прослеживаются с помощью маркерных жирных кислот. Это связано с тем, что губки содержат свойственные только им длинноцепочечные жирные кислоты, которые, возможно, используются симбионтами этих древнейших организмов. Жирные кислоты самих губок значительно отличаются от липидов более развитых беспозвоночных животных и, прежде всего, присутствием характерных «демоспонгиевых» кислот – их биосинтез выявлен только в организмах губок. Жирные кислоты, которые губка получает от симбиотических водорослей короткоцепочечные, причем многие из них могут синтезироваться, только водорослью, другие же организмы получают их только через пищевую цепь [4]. При этом в липидном экстракте губок большая доля приходится на хлорофиллы – основные пигменты симбиотических водорослей [5]. Содержание этих пигментов меняется в значительных пределах в зависимости от условий обитания водорослей и всего симбиотического сообщества.

В качестве исходного образца для исследований служила губка, собранная с глубины 10 м в южной части озера Байкал. Для исключе-

ния влияния на ход дальнейших исследований стрессовых реакций переселенной в искусственные условия губки и её адаптации колонии губок содержали в течение 14 дней в стеклянных аквариумах при температуре 8-120 °С в условиях проточной водопроводной и байкальской природной воды, при 12 часовом световом режиме. Для взрослых губок использовали тридцатилитровые установки, а для молодых губок – однолитровые. В течение всего эксперимента основным способом питания губок был автотрофный. При этом среди эндосимбионтов были выделены: зоохлореллы [6]; кокки из рода *Micrococcus*; споровая палочка из рода *Bacillus*; дрожжи из рода *Rodoforula*; сферические дрожжеподобные клетки *Azomonas agilis* и палочки из рода *Pseudomonas* [3,7]. Из экзосимбионтов на губке вели активный образ жизни амфиподы *Brandtia parasitica*.

Наблюдение за ростом и развитием губок при точном контроле потока воды, освещения и температуре проводилось в течение 6 месяцев. В результате этого была доработана методика длительного содержания симбиотических организмов в аквариумах, которая позволила продолжить изучение взаимоотношений её эндо- и экзосимбионтов.

Исследования проводились с использованием проточной байкальской и водопроводной вод, ниже приведены их сравнительные характеристики по наиболее важным для жизнедеятельности губок показателям (табл.1).

Водопроводная вода закачивалась из центральной системы водоснабжения (р. Ангара) в ЦКП ПАК Лимнологического института (г. Иркутск). Вода была дополнительно очищена с использованием двухступенчатого фильтра «Аква-Фэлп», состоящего из полипропиленового фильтрующего элемента с пористостью 1 мкм и угольного, импрегнированного серебром («Воронеж-Аква», Россия) и дополнительно насыщалась кис-

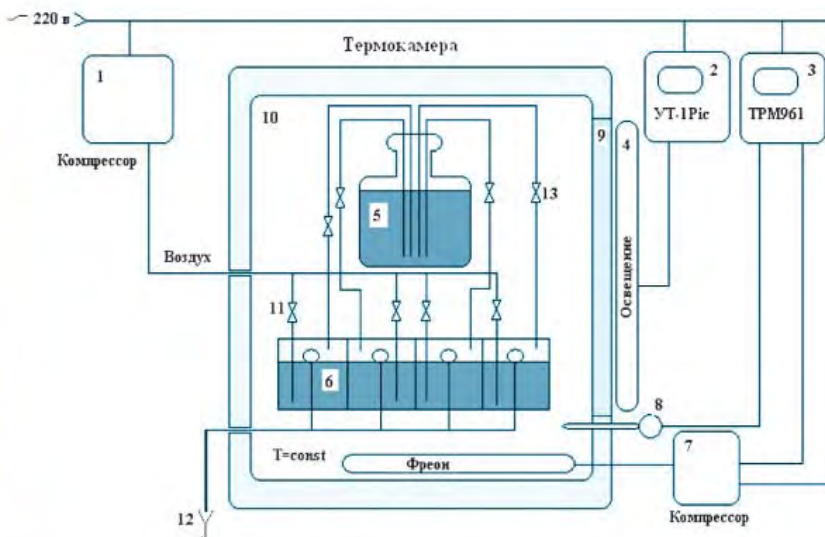


Рис. 1. Проточная система аквариумов: слева – общий вид (фото Глызиной О.Ю.), справа – схема (Любочко С.А.): 1 – компрессор; 2,3 – контроллеры освещения и температуры; 4, 9 – люминесцентные осветители и светофильтры; 5 – аквариум с проточной водой; 6 – аквариумы; 7 – компрессор; 8 – датчик температур; 10 – термокамера; 11 – кран; 12 – слив воды.

лородом. Байкальская природная вода помещалась в созданную сотрудниками института холодильную установку с проточной системой аквариумов (рис. 1). Для поддержания в больших аквариумах пониженной температуры 8-12 °С использовали прибор ТРМ202 («Овен», Россия), регулирующий с помощью электромагнитного клапана поток холодной водопроводной воды в теплообменник. В качестве источников света использовали три фотолюминесцентных светильника ЛПБ 2004А-1. Режим освещения день-ночь обеспечивали таймером УТ1-Рис («Овен», Россия). Освещенность составляла 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Воду в аквариумах барботировали пропущенным через фильтр сжатым воздухом. Состав воды регулярно контролировали, рН поддерживали в области 7,5 – 7,8, периодически снабжая среду углекислым газом. Методики биохимических анализов колоний губок приведены в предыдущих работах [2,4,5,7].

Результат и их обсуждения

Экспериментальный комплекс с регулированием факторов среды обитания позволил обнаружить некоторые особенности функционирования симбиотического сообщества байкальской губки в искусственных условиях.

Так, содержание губки в протоке водопроводной воды, дополнительно обогащенной кислородом, показало, что влияние повышенной температуры на развитую колонию

губки далеко не всегда приводит к ее гибели. В условиях проведенного эксперимента температура воды была поднята на 50 °С, что вызвало угнетение колонии губки и образование редуционных телец – «клеточных скоплений, состоящих из группы амебоцитов, одетой снаружи клетками кроющего эпителия. С наступлением благоприятных условий из этих редуционных телец развиваются новые губки» [8]. Такого явления у байкальских губок до настоящего момента



Рис. 2. Байкальская губка *Lubomirskia baicalensis* живущая в проточной водопроводной воде в период выхода личинок (фото Короткоручко В.А.).



Рис. 3. Редукционные тела губки, слева – на поверхности тела губки (фото Глызиной О.Ю.), справа – самостоятельное развитие редукционных тел (фото Дидоренко С.И.).

не описывалось в научной литературе. К тому же эти искусственно измененные условия вызвали активизацию полового размножения губок – ранний выход личинок. Судя по изменению состава маркерных жирных кислот и хлорофиллов, определяющих трофические взаимодействия симбионтов, у внешне здоровой губки (рис.2), наблюдается изменение роли авто- и гетеротрофного питания, ослабляется фильтрационная способность, усиливается рост бактериальных эндосимбионтов и снижается активность амфипод [4,5,7].

Проведенные нами исследования показали, что после трёх месяцев инкубации губки в проточной водопроводной воде происходят следующие изменения в функционировании сообщества: достаточно быстро снижается массовая доля водорослей в общей массе эндосимбионтов, но видовой их состав не меняется; снижается общее количество демоспонгиевых кислот; изменяется состав эндосимбионтов бактериального происхождения [7], а после шести месяцев инкубации на поверхности тела губки появляются редукционные тельца, в которых большую часть занимают клетки симбиотических водорослей. Через 20-25 дней эти тела отсоединяются от губки и начинают самостоятельное развитие (рис. 3). В контрольных опытах, где колонии губок жили на проточной байкальской природной воде в практически естественных для них условиях, таких изменений функциональных показателей жизни симбиотического сообщества байкальской губки не выявлено.

Заключение

В результате работы было доказано, что длительное нахождение и содержание пресноводных байкальских губок в ПАК позволяет выявлять их адаптивные реакции, а сами губки путем постепенного

перехода в другие условия обитания сохранять жизненно важные свойства сложного симбиотического сообщества.

Культивирование колоний губок и их редукционных тел губок *in vitro* с применением ПАК в течение длительного времени позволило создать управляемую живую модель в экспериментально контролируемых условиях.

Использование ПАК позволило сократить смертность организмов и ускорить их адаптацию к обитанию в искусственных условиях. Это дает возможность в дальнейшем исследовать процессы роста, дифференциации и физиологические функции клеток губки, идентифицировать белки, вовлеченные в процесс биоминерализации и расшифровать их гены; исследовать спектр вторичных метаболитов губки в различных условиях.

Проведенные нами исследования подтвердили, что снижение функциональных показателей всего симбиотического сообщества губки при содержании в аквариумах начинается задолго до того, как это проявится внешне. Таким образом, для успешного содержания эндемичных видов гидробионтов, особенно сложных симбиотических сообществ, желателен комплекс современных методов исследования гидробионтов, которые позволяют быстро и с высокой степенью чувствительности обнаруживать изменения жизненного состояния организмов, содержащихся в аквариумах.

В дальнейшем использование этих экспериментальных аквариумных комплексов позволит не только выявить новые особенности жизни гидробионтов экосистемы ультраолиготрофного озера Байкал, оценить их изменчивость в искусственных и естественных условиях, но и получить устойчивые аквакультуры ценных видов. Подобные «пилотные» исследования с помощью модельных установок и при хорошем планировании и выполнении приносят дополнительную пользу помимо практических и прикладных научных результатов по изучению, содержанию и культивированию гидробионтов в искусственных экосистемах. Часто проблемы, возникающие при отборе проб или при повседневном наблюдении за гидробионтами, удастся разрешить только после проведения специальных модельных исследований в искусственных экосистемах.

Исследования с помощью усовершенствованных аквариумных установок со сложным многоуровневым (многопозиционным) набором датчиков и автодозаторов могут вносить значительный вклад в фундаментальные теоретические знания, направленные



ные на повышение благополучия гидробионтов и сохранение их видов *ex situ* и *in situ*. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории гидрохимии и химии атмосферы Лимнологического института СО РАН за помощь в исследовании проб воды. Работа выполнена при поддержке целевой программы РАН «Виварии».

Литература

1. Ефремова С.М. Проблемы и перспективы изучения байкальских губок. // Новое о фауне Байкала. 1982. С. 38-43.
2. Kamaltynov R.M., Chernykh V.I., Slugina Z.V., Karabanov E.B. The conxorcium of the sponge *Lubomirskia baicalensis* in Lake Baikal, East Siberia. *Hydrobiologia*, 1993, 271.- p.179-189.

3. Жукова Н.В. Участие симбионтов в биосинтезе липидов байкальской губки *Lubomirskia baicalensis* // Байкал – природная лаборатория для исследования изменений окружающей среды и климата, Иркутск, 1994. Тез. докл. – Иркутск: ЛИСНА. 1994. Т. 5. С. 112.

4. Latyshev N.A., Zhukova N.V., Efremova S.M., Imbs A.B., Glyzina O.I. Effect of habitat on participation of symbionts in formation of the fatty acid pool of freshwater sponges of Lake Baikal. // *Comp. Biochem. Physiol.* 1992. № 102B (4). С.961-965.

5. Глызина О.Ю., Барам Г.И. Исследование фотосинтетических пигментов симбиотических водорослей байкальских губок. // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2002. №10. С.301-305.

6. Masuda Y. Electron Microscopic Study on the Zoochlorellae of Some Freshwater Sponges // *Fine structure of freshwater sponge zoochlorellae*. 3d. *Ins. Sponge Conf.* 1985.- p.467-471.

7. Глызина О. Ю., Глызин А. В., Барам Г. И., Латышев Н. А. Индикаторы жизненного состояния байкальской губки при содержании в аквариумах с использованием масс-спектрометрии и жидкостной хроматографии // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2007. №15(6). С.659-662.

8. Жизнь животных. Под ред. Л.А. Зенкевич. М.: Просвещение, 1968. Том.1. С.193-220.

A.V. Glyzin, O.Yu. Glyzina, S.A. Lyubochko

INVESTIGATION OF BAIKAL HYDROSIMBIANTS WITH PILOT AQUARIAN COMPLEXES

On the basis of Limnological research centre of Russian Academy of Sciences (Siberian Branch) fresh-water aquarian complex (FWAC) was constructed in July 2009. It has been still exploited as multiple-access centre. It includes running and closed aquarian complexes with environment parameter regulation (temperature, light conditions, pH, oxygen concentration etc.). Experiments which

couldn't be made in the field work are carried out in the centre. Modern biochemical analyses (thin-layer chromatography, gas-liquid chromatography, high-yield liquid chromatography, mass spectrometry) may be applied in FWAC. As a result effective and quick determination of bioactive substance change in life forms may be done with high precision. Sustainable aquacultures of certain

components can be obtained in FWAC. Results of FWAC investigation for symbiotic assemblage of Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis* (6 month incubation period) are represented.

Key words: fresh-water aquarian complex, hydrobionts, lake Baikal