ISSN 0868-854 (Print); *ISSN 2413-5984 (Online).*
Algologia. 2020. 30(3): 250–260
https://doi.org/10.15407/alg30.03.250

Важность выбора фазы роста культуры при скрининге экстрактов *Chlamydomonas* spp. на антибактериальную активность

Геруса Н.А. Сеньорино [1], Карита Ланнер[2], Джон А. Скотт[1]

[1]*Инженерная школа Барти, Лаврентийский университет,*
935 Ремсли Лейк Роуд, Садбери, Онтарио, P3E 2C6 Канада
[2]*Медицинский факультет Северного Онтарио,*
935 Ремсли Лейк Роуд, Садбери, Онтарио, P3E 2C6 Канада

gsenhorinho@laurentian.ca
clanner@nosm.ca
jascott@laurentian.ca

Поступила в редакцию 17.04.2020. После доработки 14.05.2020
Подписана в печать 06.07.2020. Опубликована 24.09.2020

Реферат

Изучен ростовой цикл 5 штаммов *Chlamydomonas* Ehrenberg (*Chlorophyta*), выделенных из разных водоемов в Онтарио (Канада). Ранее было показано, что они обладают ингибирующей активностью в отношении Staphylococcus aureus. Зеленые микроводоросли известны своей способностью продуцировать метаболиты с антибактериальной активностью, но данных о том, продуцируют ли они антибактериальные соединения на протяжении всех фаз роста и в какой момент ростового цикла они продуцируют их максимальное количество, пока очень мало. Для массового скрининга таких штаммов важно знать, в какой момент ростового цикла клетки начинают вырабатывать биоактивные соединения и когда они достигают максимальных уровней их производства. Аксенические культуры микроводорослей выращивали в инкубаторе. Скорость роста штаммов определяли методом спектрофотометрии при 550 нм каждые 7 дней. Отбор биомассы для экстрагирования также проводили каждые 7 сут, начиная с ранней экспоненциальной фазы и заканчивая на 49-е сут, когда культуры находились на ранней стационарной фазе роста. Результаты показали,

что, поскольку экстракты проявляют антибактериальную активность в течение всего периода роста, их можно отбирать для первоначального скрининга в начале экспоненциальной фазы, но если требуется высокий уровень активности, биомассу следует собирать в конце экспоненциальной фазы роста.

Ключевые слова: зеленые микроводоросли, аксенические культуры, антибактериальная активность, фазы роста

Введение

Известно, что микроводоросли вырабатывают ряд соединений, представляющих коммерческий интерес, как, например, полисахариды, белки, витамины, жирные кислоты и пигменты (Cardozo et al., 2007; Sasso et al., 2012; Skjånes et al., 2012; Abd El Baky, El-Baroty, 2013; Koller et al., 2014; Michalak, Chojnacka, 2015). Эти соединения являются либо результатом первичного метаболизма микроводорослей, либо их вторичными метаболитами (Trick et al., 1984). Они обладают разнообразными биологически активными свойствами, оказывая антиоксидантное, противоопухолевое, альгицидное, противовирусное и противогрибковое действие (Mudimu et al., 2014; Ruffell et al., 2016; Pina-Perez et al., 2017).

В опытах с экстрактами микроводорослей было установлено, что некоторые штаммы способны продуцировать метаболиты, которые ингибируют патогенные бактерии (Navarro et al., 2016; Senhorinho et al., 2018). Антибактериальная активность биологических объектов обычно связана с выработкой вторичных метаболитов (Leflaive, Ten-Hage, 2007), которые являются результатом накопления промежуточных и конечных продуктов первичного метаболизма клетки (Malik, 1980). Считается, что образование вторичных метаболитов происходит в конце экспоненциальной фазы или в начале стационарной фазы роста (Skulberg, 2000; Leflaive, Ten-Hage, 2007), поэтому выбор момента при отборе биомассы является потенциально важным фактором при выявлении антибактериальной активности (Aremu et al., 2014).

Хотя интерес к исследованию антибактериальной активности микроводорослей возрастает (Mudimu et al., 2014; Lauritano et al., 2016, Corona et al., 2017; Senhorinho et al., 2018), пока еще мало данных о том, в какой фазе роста культуры микроводоросли начинают вырабатывать антибактериальные метаболиты. Поэтому отбор биомассы для скрининга, как правило, происходит в случайно выбранный момент роста культуры, находящейся в экспоненциальной или стационарной фазе роста (Najdenski et al., 2013; Li et al., 2016). Для ускорения массового скрининга микроводорослей с целью обнаружения штаммов с антибактериальной активностью отбор биомассы из культуры должен проводиться с момента, когда клетки только начинают вырабатывать биоактивные соединения. В некоторых случаях, например при исследовании минимальной ингибирующей концентрации (МИК) таких соединений, отбор биомассы лучше

производить в тот момент ростового цикла, когда клетки вырабатывают высокий уровень биоактивных соединений.

Для изучения этого вопроса мы исследовали 5 штаммов *Chlamydomonas* spp., выделенных из водоемов, расположенных вблизи заброшенных шахтных участков в Онтарио. Ранее было показано, что эти штаммы обладают антибактериальной активностью (МИК 16–128 мкг/мл) против Staphylococcus aureus (Senhorinho et al., 2018). Целью данного исследования было определение самого раннего момента ростового цикла, в котором клетки *Chlamydomonas* начинают вырабатывать антибактериальные соединения, а также фазу роста, в которой экстракт биомассы имеет максимальный уровень концентрации биоактивных соединений, подавляющих рост *S. aureus*.

Материалы и методы

Штаммы микроводорослей и условия их культивирования

Материалом для работы послужили 5 штаммов *Chlamydomonas* spp., выделенных из водоемов, расположенных вблизи заброшенных шахтных участков в Онтарио, для которых ранее была подтверждена антимикробная активность (Senhorinho et al., 2018). Тогда скрининг биомассы, проведенный на 28-е сутки роста культуры, выявил, что их экстракты подавляют рост грамположительных бактерий, в частности Staphylococcus aureus ATCC 25923, патогена, вызывающего оппортунистические инфекции человека (Senhorinho et al., 2018). В исследование были включены коллекционные штаммы *Chlamydomonas reihardtii* PADangeard CPCC11(Cr), экстракт которого проявлял антибактериальную активность на 28-е сут роста, а также *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing UTEX 1237 (Sd), который не проявлял какой-либо антибактериальной активности после выращивания в течение 28 дней.

Для эксперимента сухую биомассу зеленых микроводорослей (10–22 г), выращенную в течение 10 сут на чашках с агаризованной средой Болда (BBM) при 21 ± 2 °C, в режиме освещенности свет : темнота = 12 : 12 ч, при интенсивности света 70–80 мкмоль фотона $м^{-2}·с^{-1}$, помещали в колбы, содержащие 500 мл жидкой BBM и выращивали в режиме периодической культуры. Затем в течение 49 сут их выращивали в инкубаторе (INFORS HT Multitron Standard, Анжу, Квебек, Канада) при 25 °C и непрерывном перемешивании при 125 об/мин в условиях фотосинтетического света (Sylvania Gro-Lux F15W/Gro T8, Padstow, Новый Южный Уэльс, Австралия) с циклом свет:темнота 12 : 12 (70–80 мкмоль фотона $м^{-2}·с^{-1}$). Культуры каждые 3 дня тестировали на контаминацию путем посева клеток водорослей на питательный агар (EMD Chemicals Inc., Дармштадт, Германия) и 2%-ный агар глюкозы Sabouraud (Fluka Analytical, Seelze, Германия), которые инкубировали в течение 7 дней при 37 и 25 °C соответственно. В исследовании использовали только аксенические культуры.

Получение экстракта микроводорослей

Каждые 3 дня в течение 48 сут 1 мл культуральной взвеси в трех повторностях использовали для определения оптической плотности культур (спектрофотометр UV-1700 UVVIS, Shimadzu, Токио, Япония) при длине волны 550 нм. Каждые 7 дней в течение 49 сут отбирали 500 мл каждого штамма микроводоросли, центрифугировали при 2000 g в течение 15 мин, дважды промывали стерильной водой MilliQ, замораживали при минус 80 °C, лиофилизировали и взвешивали. Полученную биомассу сразу использовали для приготовления экстрактов, которые получали в соответствии с методикой, описанной Al-Wathnani et al. (2012), с изменениями. К полученной биомассе добавляли 0,08 мл метанола на 1 мг сухой биомассы и перемешивали в течение 24 ч при комнатной температуре. Процедуру повторяли 3 раза, экстракты перемешивали и фильтровали через стерильный фильтр 0,2 мкм (Nalgene, Fisher Scientific, Оттава, Онтарио, Канада). Пробирки с экстрактами помещали в вакуум для выпаривания растворителя, затем взвешивали и добавляли 100%-й диметилсульфоксид (ДМСО) для получения конечной концентрации 50 мг/мл.

Тест на антибактериальную активность

Антибактериальную активность штаммов определяли с использованием метода диффузии в агаре в соответствии с Balouiri et al., 2016, с модификациями. Экстракты были протестированы против грамположительного штамма *S. aureus* (ATCC 25923). Эту бактерию выращивали на питательной среде (EMD Chemicals Inc., Дармштадт, Германия) в течение 24 ч, доводили до 0,5 стандарта мутности Макфарланда и высевали на чашки с агаром Мюллера-Хинтона (Oxoid, Англия, Великобритания) с использованием стерильных тампонов. Каждый экстракт в количестве 2 мкл наносили на бактериальное разрастание в трех повторностях и инкубировали при 37 °C в течение 18 ч. В качестве отрицательного контроля использовали диметилсульфоксид (ДМСО) (2 мкл), а диски с антибиотиками (10 мкг) ампициллином и стрептомицином (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, США) служили в качестве положительного контроля. Эксперименты выполнены в трех повторностях.

Статистический анализ

Все значения представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка среднего (СОС). Статистический анализ выполняли с использованием IBM SPSS Statistics для Macintosh, версия 21 (IBM Corp., Armonk, N.Y., США). С помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями (ANOVA) и поправкой Гринхауса-Гейссера с последующим тестом Бонферрони определены различия в антибактериальной активности штаммов разного срока культивирования. Различия считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Динамика роста аксенических культур микроводорослей характеризуется 5 фазами (Coutteau, 1996). Это лаг- или индукционная фаза, в которой происходит физиологическая адаптация для роста; экспоненциальная фаза, где плотность клеток увеличивается экспоненциально; фаза снижения темпов роста, когда химические и физические факторы начинают ограничивать рост; стационарная фаза, где наблюдается относительно постоянная плотность клеток, и фаза гибели, где плотность клеток быстро уменьшается и клетки в итоге погибают (Coutteau, 1996). Продукция вторичных метаболитов из микроводорослей обычно происходит во время экспоненциальной или стационарной фазы (Leflaive, Ten-Hage, 2007). В данном исследовании, поскольку микроводоросли ранее выращивали в течение 10 дней на агаре BBM, фаза отставания была укорочена (Coutteau, 1996), на 7-й день, когда клетки впервые были отобраны для экстрагирования, они находились в ранней экспоненциальной фазе (рис. 1). Конечный отбор микроводорослей производили на 49-й день, который был ранней стационарной фазой (рис. 1, 2).

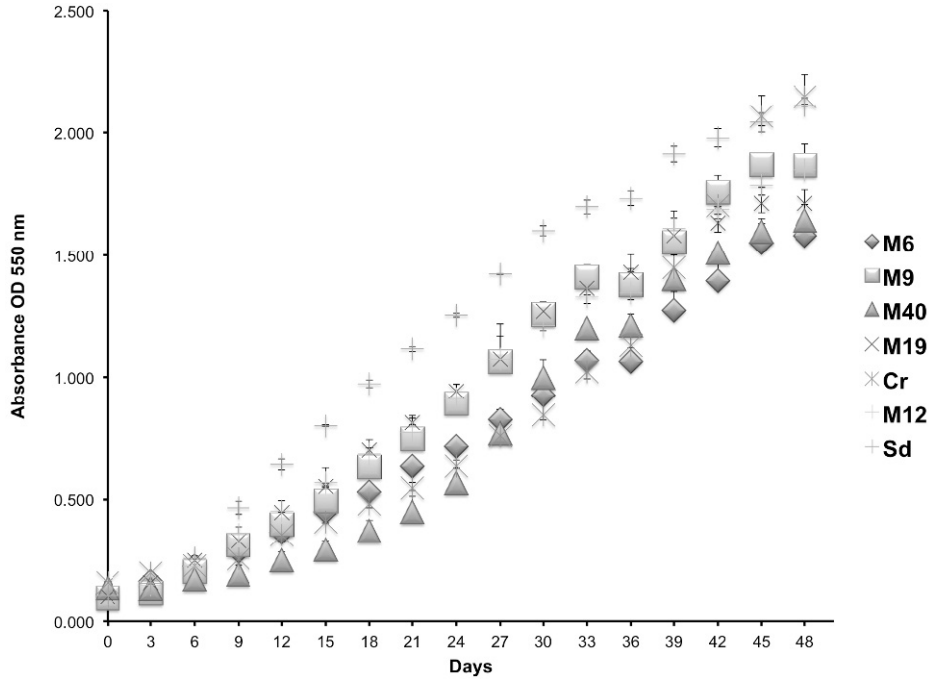

Рис. 1. Скорость роста штаммов микроводорослей по данным спектрофотометрического анализа при 550 нм. Культуры на жидкой среде Болда анализировали каждые 3 дня в течение 48 дней. Результаты на обоих рисунках выражены в виде среднего ± СОС (n = 3). Здесь, а также на рис. 2 и в таблице: M9 – M40 – экстракты из оригинальных штаммов *Chlamydomonas* spp; Cr – екстракт *C. reinhardtii* CPCC11; Sd – *Scenedesmus dimorphus* UTEX 1237

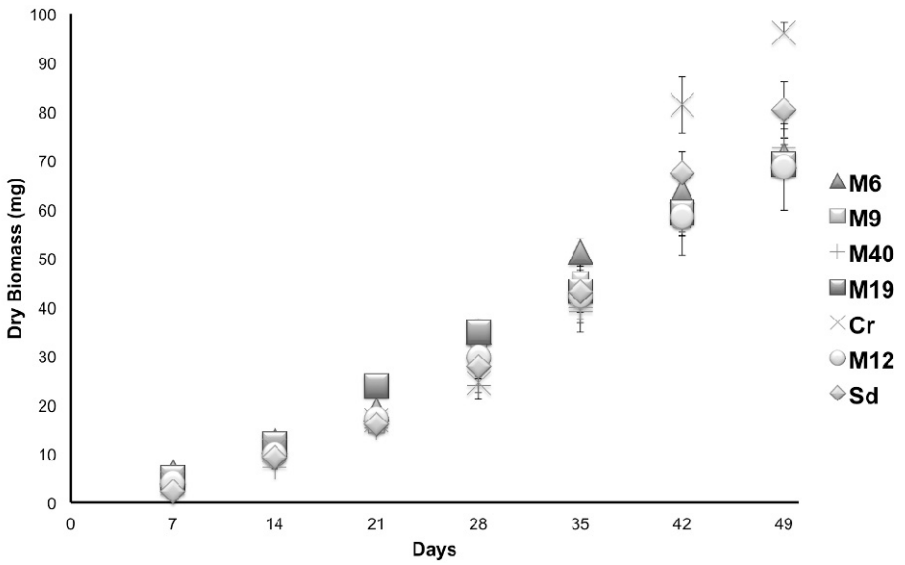

Рис. 2. Прирост сухой биомассы штаммов микроводорослей на 49-е сут роста на жидкой среде Болда

Экстракты микроводорослей могут обладать биологической активностью, в т.ч. антибактериальной (Senhorinho et al., 2015; Pina-Perez et al., 2017). Однако в предыдущих исследованиях их получали из биомассы, отобранной случайным образом в фазе экспоненциального или стационарного роста (Cooper et al., 1983; Ördög et al., 2004; Leflaive, Ten-Hage, 2007; Lauritano et al. al., 2016). Дебро и Уорд (Debro, Ward, 1979) протестировали одну культуру, отобранную в период экспоненциальной фазы роста и одну – в стационарной фазе, и обнаружили, что большинство зеленых микроводорослей имеют более высокую антибактериальную активность в экспоненциальной фазе по сравнению со стационарной, что согласуется с нашими данными. Наши исследования показали, что у всех биологически активных штаммов экстрактов *Chlamydomonas* spp. наблюдаются сходные закономерности антибактериальной активности, причем более высокая активность отмечена в экспоненциальной фазе (35-й день), чем в начале стационарной фазы (49-й день; см. таблицу).

В нашем исследовании мы оценивали только внутриклеточные экстракты. Однако снижение антибактериальной активности экстрактов оригинальных штаммов в ранней стационарной фазе роста может свидетельствовать о том, что либо клетки *Chlamydomonas* spp. вырабатывают на этой стадии меньше антибактериальных соединений, либо они начали выделять антибактериальные соединения в культуральную среду.

Таблица. **Антибактериальная активность экстрактов зеленых микроводорослей на разных етапах роста культур по результатам измерения зон ингибирования Staphylococcus aureus**

Штамм	Возраст культуры, сут							МИК, кг/мл на 28-е сут роста (Senho-rinho et al., 2018)
	7	14	21	28	35	42	49	
	Зона ингибирования, мм (средние значения ± СОС)							
M6	11,5±0,5	10,3±0	0	11,6±0,5	15,8±0,1	13,6±0,6	7,2±0,1	128
M9	13±0,7	11,1±0,1	9,8±0,4	11,5±1,2	15,6±0,6	13,8±0.3	5,7±0,2	32
M12	10,9±0,7	10,8±0,1	8±0	10,8±1,6	15,4±0,3	15,7±0,8	8,3±0,2	16
M19	12,7±0,3	9,1±0,1	9,6±0,3	11,8±1,0	15,8±0,4	14,3±0,3	6,5±0,5	32
M40	10,3±1,0	10±1,3	0	8,4±1,0	13,3±0,2	0	0	32
Cr	12,1±1,7	11,4±0,4	8,2±0	7,2± 0,2	0	0	0	>1024
Sd	12,8±1,2	9±0	0	0	0	0	0	Не исследовали

П р и м е ч а н и е : МИК – минимальная ингибирующая концентрация экстрактов, которая полностью ингибирует рост *S. aureus*.

Известно, что во время стационарной фазы плотность клеток становится относительно постоянной, поскольку лимитирующие факторы, такие как питательные вещества и pH, начинают ограничивать рост культуры (Coutteau, 1996). Номен с соавт. (Noaman et al., 2004) наблюдали наибольшую антибактериальную активность внеклеточных экстрактов цианобактерии *Synechococcus leopoliensis* (Raciborski) Komárek при сборе во время стационарной фазы роста, что позволяет предположить, что на этой ее фазе антибактериальные соединения высвобождаются в культуральную среду.

Экстракты всех оригинальных штаммов *Chlamydomonas* spp. ингибировали рост *S. aureus*, тогда как экстракты из культур коллекционных штаммов *C. reinhardtii* и *S. dimorphus* проявляли антибактериальную активность только до 28 и 14 сут (экспоненциальная фаза) соответственно. Возможно, эти штаммы после указанных суток культивирования вырабатывали меньшие количества антибактериальных соединений, которые не были обнаружены методом диффузии в агаре или они прекратили продуцировать активные соединения, как ранее наблюдалось с цианобактериями (Ploutno, Carmeli 2000). Хотя метод диффузии в агаре не является золотым стандартом для определения антибактериальной активности, это быстрый и недорогой метод для

скрининга большого количества штаммов микроводорослей и выбора наиболее перспективных из них для дальнейшего анализа с помощью теста МИК.

Как следует из ранее полученных результатов относительно МИК (см. таблицу), экстракты из *C. reinhardtii* CPCC11 показали более слабую антибактериальную активность в отношении *S. aureus*, чем любой экстракт оригинальных штаммов *Chlamydomonas* spp. Аналогично, экстракты из *S. dimorphus* UTEX 1237 проявляли антибактериальную активность только в начале экспоненциальной фазы, т. е. до 14 сут культивирования. Это наблюдение подтверждается нашей более ранней работой, в которой антибактериальная активность *S. dimorphus* не была обнаружена при скрининге на 28-е сут (Senhorinho et al., 2018). В то же время имеются сведения (Debro, Ward, 1979), что экстракты из штамма *C. reinhardtii* проявляют одинаковую антибактериальную активность в экспоненциальной и стационарной фазах, чего не наблюдалось в нашем исследовании. Это можно объяснить тем, что, антибактериальная активность зеленых микроводорослей может отличаться не только на уровне видов, но и среди штаммов (Ördög et al., 2004; Aremu et al., 2014; Senhorinho et al., 2015). Отрицательный контроль, ДМСО, не показал какого-либо ингибирования роста *S. aureus* (данные не представлены).

Как видно из таблицы, штаммы *Chlamydomonas* spp. существенно отличаются по антибактериальной активности в зависимости от возраста культуры ($P < 0{,}05$). Их экстракты, выделенные из биомассы, находящейся в конце экспоненциальной фазы роста (35-е сут), проявляют более высокое бактериальное ингибирование ($P = 0{,}014$), чем полученные из биомассы в начале стационарной фазы роста (49-е сут, см. таблицу). Экстракты штаммов M6 и M40 не проявляли антибактериальной активности на 21-е сут культивирования, однако эта активность вновь появилась на 28-е сут. Поскольку метаболиты микроводорослей продуцируются в очень небольших количествах (Hernandez-Carlos, Gamboa-Angulo, 2011), любое уменьшение содержания антибактериальных соединений в процессе роста культуры, вероятно, приводит к получению отрицательного результата при ее анализе.

Заключение

Оригинальные дикие штаммы *Chlamydomonas* spp. имеют значительный потенциал как источники антибактериальных соединений. При этом следует учитывать, что разные виды и штаммы микроводорослей демонстрируют разные паттерны производства антибактериальной активности во время роста клеток, что наблюдается как для диких, так и для коллекционных штаммов. Внутриклеточные экстракты из выделенных из природы штаммов *Chlamydomonas* spp. проявляют более высокую антибактериальную активность в отношении *S. aureus* при сборе в конце экспоненциальной фазы роста по сравнению с любой другой точкой

тестируемой кривой роста. Кроме того, штаммы *Chlamydomonas* spp. проявляют антибактериальную активность уже на 7-й день роста культуры и (для большинства штаммов) в течение всей экспоненциальной фазы роста. Эти результаты позволяют предположить, что отбор биомассы для первоначального антибактериального скрининга может быть проведен на ранней стадии экспоненциальной фазы, что будет имеет большое значение для программы массового скрининга.

Авторы благодарят Центры передового опыта Онтарио (OCE) и Mitacs of Canada за грантовую поддержку.

REFERENCES

Abd El-Baky H., El-Baroty G.S. 2013. The potential use of microalgal carotenoids as dietary supplements and natural preservative ingredients. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 22(4): 392–406.

Al-Wathnani H., Ara I., Tahmaz R.R., Al-Dayel T.H., Bakir M.A. 2012. Bioactivity of natural compounds isolated from cyanobacteria and green algae against human pathogenic bacteria and yeast. *J. Med. Plants Res*. 6(8): 3425–3433.

Aremu A.O., Masondo N.A., Stirk W.A., Ordog V., Staden J.V. 2014. Influence of culture age on the phytochemical content and pharmacological activities of five *Scenedesmus* strains. *J App. Phycol*. 26(1): 407–415.

Balouiri M., Sadiki M., Ibnsouda S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal*. 6(2): 71–79.

Cardozo K.H., Guaratini T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P., Pinto E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Com. Biochem. Physiol*. 146(1–2): 60–78.

Cooper S., Battat A., Marsot P., Sylvestre M. 1983. Production of antibacterial activities by two *Bacillariophyceae* grown in dialysis culture. *Can. J. Microbiol.* 29(3): 338–341.

Corona E., Fernandez-Acero J., Bartual A. 2017. Screening study for antibacterial activity from marine and freshwater microalgae. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 8(1): 189–194.

Coutteau P. 1996. In: *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. Rome, Lazio: Food and Agricult. Org. United Nat. Publ. Pp. 7–47.

Debro L.H., Ward H.B. 1979. Antibacterial activity of freshwater green algae. *Planta Med.* 36(4): 375–378.

Hernandez-Carlos B., Gamboa-Angulo M.M. 2011. Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochem. Rev*. 10(2): 261–286.

Koller M., Muhr A., Braunegg G. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* 6A: 52–63.

Lauritano C., Andersen J.H., Hansen E., Albrigtsen M., Escalera L., Esposito F., Helland K., Hanssen K.O., Romano G., Ianora A. 2016. Bioactivity Screening of Microalgae for antioxidant, anti inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Front. Mar. Sci*. 3: 68.

Leflaive J.P., Ten-Hage L. 2007. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshwat. Biol.* 52(2): 199–214.

Li A., Zhang L., Zhao Z., Ma S., Wang M, Liu P. 2016. Prescreening, identification and harvesting of microalgae with antibacterial activity. *Biologia*. 71(10): 1111–1118.

Malik V.S. 1980. Microbial secondary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 5(3): 68–72.

Michalak I., Chojnacka K. 2015. Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci*. 15: 160–176.

Mudimu O., Rybalka N., Bauersachs T., Born J., Friedl T., Schulz R. 2014. Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects. *Metabolites*. 4(2): 373–393.

Najdenski H.M., Gigova L.G., Iliev I.I. Pilarski P.S., Lukavsky J., Tsvetkova I.V., Ninova M.S., Kussovski V.K., Ruiz-Domínguez M.C., Garbayo I., Castaño M.Á., Vílchez C., Vega J.M. 2013. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *Int. J. Food Sci. Technol.* 48(7): 1533–1540.

Navarro F., Forján E., Vázquez M., Toimil A., Montero Z. 2016. Antimicrobial activity of the acidophilic eukaryotic microalga *Coccomyxa onubensis*. *Phycol. Res*. 65(1): 38–43.

Noaman N.H., Fattah A., Khaleafa M., Zaky S.H. 2004. Factors affecting antimicrobial activity of *Synechococcus leopoliensis*. *Microbiol. Res.* 159(4): 395–402.

Ördög V., Stirk W. A., Lenobel R., Bancirová M., Strnad M., van Staden J., Szigeti J., Németh L. 2004. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *J. Appl. Phycol.* 16(4): 309–314.

Pina-Perez M.C., Rivas A., Martinez A., Rodrigo D. 2017. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chem.* 235: 34–44.

Ploutno A., Carmeli S. 2000. Nostocyclyne A, a novel antimicrobial cyclophane from the cyanobacteriam *Nostoc* sp. *J. Nat. Prod.* 63(11): 1524–1526.

Ruffell S., Muller K.M., McConkey B.J. 2016. Comparative assessment of microalgal fatty acids as topical antibiotics. *J. App. Phycol*. 28(3): 1695–1704.

Sasso S., Pohnert G., Lohr M., Mittag M., Hertweck C. 2012. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiol. Rev.* 36(4): 761–785.

Senhorinho G.N.A., Laamanen C.A., Scott J.A. 2018. Bioprospecting freshwater microalgae for antibacterial activity from water bodies associated with abandoned mine sites. *Phycologia*. 57(4): 432–439.

Senhorinho G.N.A., Ross G.M., Scott J.A. 2015. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics. *Phycologia*. 54(3): 271–282.

Skjånes K., Rebours C., Lindblad P. 2012. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33(2): 172–215.

Skulberg O.M. 2000. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. *J. App. Phycol.* 12(3): 1–8.

Trick C.G., Andersen R.J., Harrison P.J. 1984. Environmental factors influencing the production of an antibacterial metabolite from a marine dinoflagellate, *Prorocentrum minimum*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41(3): 423–432.

Подписала в печать Е.К. Золотарева

Gerusa N.A. Senhorinho[1], *Carita Lannér*[2], *John A. Scott*[1]

[1]Bharti School of Engineering, Laurentian University,
935 Ramsey Lake Rd, Sudbury, Ontario, P3E 2C6 Canada,
[2]Division of Medical Sciences, Northern Ontario School of Medicine,
935 Ramsey Lake Rd, Sudbury, Ontario, P3E 2C6 Canada

The importance of harvesting time on the screening of *Chlamydomonas* spp. extracts for antibacterial activity

Photosynthetic green microalgae are being investigated for their ability to produce metabolites with antibacterial activity. During microalgal screening for antibacterial activity, researchers usually choose a relatively random harvesting day in either the exponential or early stationary phase. However, little is known about whether microalgae produce metabolites exhibiting antibacterial activity throughout their growth phase, or at what point they produce the maximum amount. For mass screening for activity, harvesting time is a key factor and knowing if it can be conducted during the exponential phase or it has to wait until the onset of the stationary phase is essential knowledge. In this study, extracts from five *Chlamydomonas* spp., collected from different water bodies and previously shown to have inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* were investigated for antibacterial activity through their exponential growth phase until the onset of the stationary phase. The results demonstrated that as extracts exhibited antibacterial activity over the entire growth, they could be sampled for an initial screening early in the exponential phase, but if a high level of activity is required, it is suggested harvesting the biomass towards the end of the exponential phase.

K e y w o r d s : photosynthetic green microalgae, antibiotic activity, growth curve