

УДК 582.26/.27:579 (262.5)

КУЛЬТУРЫ ДИНОФИТОВЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ ЧЕРНОГО МОРЕЯ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Стельмах Л. В., Мансурова И. М., Акимов А. И.

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского, Севастополь, lustelm@mail.ru

Описана краткая история создания самой крупной на постсоветском пространстве коллекции морских планктонных водорослей, среди которых значительная доля видов относится к динофитовым. Проанализированы результаты экспериментальных исследований по оценке влияния света, температуры и различных источников азота на рост массовых видов динофитовых водорослей Черного моря. Выявлены условия, оптимальные для роста этих видов. Обсуждается практическое значение культур морских планктонных водорослей.

Ключевые слова: культуры микроводорослей, динофитовые виды водорослей, Черное море.

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование морских планктонных водорослей в лабораторных условиях имеет столетнюю историю [6]. К настоящему времени в различных странах мира (США, Англии, Австралии, Франции, Германии, Канаде, Японии и др.) существуют десятки коллекций культур микроводорослей. На постсоветском пространстве самая крупная коллекция морских планктонных водорослей находится в отделе экологической физиологии водорослей Института биологии южных морей (г. Севастополь). Эта уникальная коллекция культур морских одноклеточных водорослей начала создаваться в начале 50-х годов прошлого века по инициативе известного советского ученого профессора Нины Васильевны Морозовой-Водяницкой и благодаря огромному энтузиазму Лидии Алексеевны Ланской, работавших в то время на Севастопольской биологической станции АН СССР (ныне ИнБИОМ). Огромным толчком для расширения коллекции послужили исследования по физиологии водорослей, проводимые в Институте биологии южных морей. С этой целью в 1981 году был создан отдел экологической физиологии водорослей, которым руководит доктор биологических наук, профессор З. З. Финенко. В настоящее время в отделе активно проводятся экспериментальные исследования по физиологии морских планктонных водорослей, к которым активно привлекаются молодые ученые. Исследованиями охвачены виды, относящиеся к основным таксономическим группам, представленным в фитопланктоне Черного моря. К ним относятся, прежде всего, диатомовые и динофитовые водоросли, которые создают основную биомассу черноморского фитопланктона.

В настоящей работе представлены экспериментальные исследования на культурах, посвященные выявлению оптимальных условий по свету, температуре и биогенным веществам, необходимым для роста динофитовых водорослей Черного моря, а также обсуждается практическое значение коллекции.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования выполнены на альгологически чистых культурах динофитовых водорослей из коллекции отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ (г. Севастополь). В работе использованы следующие виды: *Prorocentrum cordatum* Ostefeld, *P. micans* Ehrenberg, *P. pusillum* Schiller, *Gyrodinium fissum* Levander, *Gymnodinium wulffii* Schiller, *Glenodinium foliaceum* Stein, *Scrippsiella trochoidea* Stein, *Heterocapsa triquetra* Ehrenberg. Водоросли выращивали в питательной среде f/2, приготовленной на основе стерильной морской воды [9]. Для оценки влияния света на рост водорослей культуры содержали при пяти интенсивностях непрерывного искусственного освещения в диапазоне от 10 до 344 мкЭ×м⁻²×с⁻¹ ФАР и температуре 21–22 °С. Световые условия создавались с помощью люминесцентных ламп PHILIPS TL RS 20W/54-765. Для оценки влияния температуры на рост культур исследуемые виды адаптировали к ее различным значениям в диапазоне от 5 до 30 °С. Адаптацию осуществляли в течение 3–6 суток. Поддержание культур в экспоненциальной фазе роста и постоянной численности клеток осуществляли за счет их разбавления свежей питательной средой.

Удельную скорость роста микроводорослей рассчитывали по приросту органического углерода с помощью уравнения:

$$\mu = \ln (C_t / C_0) / t,$$

где: μ – удельная скорость роста, сутки⁻¹, C_0 – исходная концентрация углерода, C_t – концентрация углерода через время t , мг×л⁻¹, t – время, сутки.

С целью определения содержания органического углерода и азота пробы культур исследуемых водорослей осаждали на предварительно прокаленные стекловолоконистые фильтры серии GF/C (Whatman, Германия), обрабатывали по методике, представленной в [8] и сжигали в CHN-анализаторе.

Для математического описания световой зависимости удельной скорости роста и расчетов величины начала светового насыщения роста (I_k) использовали уравнение Пуассона [11].

В экспериментах по изучению влияния различных источников азота на рост водорослей в качестве питательной основы использовали раствор Гольдберга [5]. Исходная питательная среда был разбавлена нами таким образом, чтобы содержание фосфатов и микроэлементов было в 5 раз, а азота в 20 раз меньше, чем в оригинальной среде. В трех вариантах среды использовали разные формы азота: нитраты, аммоний и мочевины. Прирост водорослей в накопительных культурах оценивали по величине переменной флуоресценции (F_0), измеренной *in vivo* при открытых реакционных центрах фотосистемы II, которая изменяется пропорционально концентрации хлорофилла a в клетках водорослей.

Интенсивность света измерялась с помощью люксметра Ю-116. Для перехода от освещенности в люксах к энергетическим единицам использовался коэффициент перехода 1000 лк = 17,2 мкЭ×м²×с⁻¹ [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние света, температуры и различных форм азота на рост динофитовых водорослей.

Основным фактором, регулирующим рост водорослей, является свет. На начальном участке световой кривой, где удельная скорость роста увеличивается по мере возрастания света, одним из основных параметров являются начало светового насыщения роста (I_k). Этот параметр соответствует интенсивности света, при которой удельная скорость роста водорослей составляет 63 % от максимального значения [11]. По нашим данным, у исследованных видов динофитовых водорослей параметр I_k различался в 5 раз. Минимальные значения (14–15 мкЭ×м⁻²×с⁻¹) получены у двух видов таких, как *P. pusillum* и *S. trochoidea*, максимальные (73 мкЭ×м⁻²×с⁻¹) – у *P. cordatum* (табл. 1).

Таблица 1

Значения максимальной удельной скорости роста (μ_{\max}), начала светового насыщения роста (I_k) и объем клеток (V) в культурах динофитовых водорослей

Вид	Параметры		
	μ_{\max} , сутки ⁻¹	I_k мкЭ×м ⁻² ×с ⁻¹	V , мкм ³
<i>P. cordatum</i>	1,36 ± 0,16	73 ± 20	1900 ± 600
<i>S. trochoidea</i>	0,72 ± 0,03	15 ± 3	6800 ± 2500
<i>P. pusillum</i>	0,67 ± 0,03	14 ± 3	50 ± 25
<i>G. fissum</i>	0,67 ± 0,10	31 ± 3	18700 ± 7300
<i>G. foliaceum</i>	0,47 ± 0,10	36 ± 2	17100 ± 5100
<i>H. triquerta</i>	0,38 ± 0,02	35 ± 2	2800 ± 800
<i>P. micans</i>	0,34 ± 0,06	28 ± 5	5200 ± 1300

Для остальных культур отмечены промежуточные значения данного параметра. Есть все основания полагать, что виды, обладающие низкими величинами I_k , могут быть более конкурентоспособны в условиях слабого освещения, которое имеет место в море на нижних

горизонтах эвфотической зоны. Согласно представленным в литературе данным, при близких световых и температурных условиях значения данного параметра у разных видов динофитовых изменялись в широком диапазоне. Так, у *Amphidinium carteri* Hulburt величина I_k составила $24 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ [12], тогда как у *P. micans* – $149 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ [7]. Что касается диатомовых водорослей, то в условиях непрерывного освещения параметр I_k , определенный по росту, у *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G.Fryxell & Hasle изменялся от 37 до $164 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, у *Nitzschia palea* Grunow составил $42 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, а у *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin был равен $51 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ [11]. Таким образом, пределы изменчивости величины I_k у динофитовых и диатомовых водорослей достаточно широкие и свидетельствуют об отсутствии существенных различий этого параметра между данными группами, а также о возможности водорослей расти с максимальной скоростью при разных световых условиях.

Максимальная удельная скорость роста исследованных видов, измеренная при температуре 21–22 °С, различалась от $0,34 \text{ сутки}^{-1}$ у *P. micans* до $1,36 \text{ сутки}^{-1}$ у *P. cordatum*, что в среднем составило $0,66 \text{ сутки}^{-1}$. Полученные нами данные по максимальной удельной скорости роста для динофитовых водорослей подтверждают существующее мнение о том, что для них в целом характерны более низкие значения этого параметра по сравнению с диатомовыми [13]. Эти различия достигают двух – трех раз и, по-видимому, связаны с более высокими значениями отношения между органическим углеродом и хлорофиллом *a* в клетках динофитовых водорослей. Принято считать, что такие различия в величине отношения *C/Xл a* между диатомовыми и динофитовыми видами водорослей являются генотипическими [13].

Минимальная температура, при которой начинается рост динофитовых водорослей ($T_{\text{мин}}$), для разных видов неодинакова (табл. 2). Так, для большинства исследованных культур ее значение составляло 10–12 °С. Однако такой вид, как *P. cordatum*, не рос при температуре 10 °С, а у *H. triquetra* начало роста отмечено при 5 °С.

Таблица 2

Удельная скорость роста динофитовых водорослей при различных температурах

μ , сутки ⁻¹ температура	Виды водорослей					
	<i>P. cordatum</i>	<i>H. triquetra</i>	<i>G. fissum</i>	<i>G. wulffii</i>	<i>P. pusillum</i>	<i>P. micans</i>
$\mu_{\text{мин}}$	0	0,09	0,14	0,07	0,23	0,08
T при $\mu_{\text{мин}}$	10	5	10	12	10	10
$\mu_{\text{макс}}$	0,73	0,83	0,69	1,10	0,76	0,36
T при $\mu_{\text{макс}}$	23	19	24	24	21	23
μ при $T_{\text{макс}}$	0,41	0	0,41	0,87	0	0,23
$T_{\text{макс}}$	30	29	29	29	29	29
Пределы $T_{\text{оптим}}$	18–25	16–21	18–26	21–29	18–23	18–26

Что касается максимальной удельной скорости роста ($\mu_{\text{макс}}$), то она наблюдалась при разных температурах у исследованных водорослей. У *H. triquetra* максимальный рост отмечен при 19 °С, тогда как у *G. fissum* и *G. wulffii* – при 24 °С. Для остальных видов максимальная удельная скорость роста наблюдалась при 21–23 °С. Область оптимальных температур (пределы $T_{\text{оптим}}$) неодинакова у разных видов. Видно, что наиболее низкие температуры (16–21 °С), необходимые для оптимального роста, выявлены для *H. triquetra*, а наиболее высокие (21–29 °С) – для *G. wulffii*. Максимальная температура, при которой водоросли были еще способны осуществлять рост, одинакова для большинства исследованных видов и составила 29 °С. Отсюда можно заключить, что область температур, в пределах которой динофитовые водоросли Черного моря способны расти, достаточно широкая: от 10 до 29 °С. Поэтому массовые виды динофитовых, такие, как *P. micans* и *P. cordatum* присутствуют в планктоне Черного моря в течение всего года. Однако максимальное их развитие наблюдается, как правило, летом [4].

Рост водорослей зависит не только от температуры и света, но и от биогенных элементов, среди которых наиболее важную роль играет азот. Основным источником минерального азота для фитопланктона являются нитраты и аммоний, а органического – мочевины. Наши исследования показали, что в условиях слабого света ($12\text{--}19 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) рост таких видов, как *G. fissum* и

P. cordatum осуществлялся с одинаковой скоростью на всех трех формах азота в течение 7 суток, о чем свидетельствуют практически одинаковые значения F_0 (рис. 1). Однако в этих же световых условиях и при неизменной температуре рост *H. triquetra* на нитратах и мочеvine был существенно выше, чем на аммонийном азоте. Видно, что значения переменной флуоресценции в культуре данного вида, росшей на нитратах и мочеvine в течение 25 суток эксперимента, были в 2–3 раза выше, чем на аммонии. Отсюда следует, что данный вид водорослей на фоне слабого освещения в условиях дефицита нитратов и мочеvine, но достаточном количестве аммония в море может уступать в конкурентной борьбе за азот другим видам динофитовых водорослей. В условиях, при которых свет не лимитировал рост исследуемых водорослей ($105 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$), такие виды, как *P. cordatum* и *H. triquetra* осуществляли прирост приблизительно с одинаковой скоростью на всех трех формах азота. В результате значения F_0 различались слабо в течение эксперимента. Однако третий вид водорослей *G. fissum* осуществлял свой рост на нитратах и аммонии лучше, чем на мочеvine. Флуоресценция культуры, росшей на мочеvine, была в 1,5–2 раза ниже, чем на нитратах и аммонии. На основе полученных результатов можно говорить о существовании видоспецифичности в отношении способности водорослей усваивать разные формы азота.

Практическое значение культур морских планктонных водорослей. В последние годы микроводоросли стали использовать не только для выполнения фундаментальных исследований, но и для решения ряда прикладных задач. Морские одноклеточные водоросли привлекают внимание исследователей как источник биологически активных веществ, токсинов и кормовой объект для организмов высших трофических уровней, а также как один из наиболее чувствительных индикаторов загрязнения Черного моря.

В настоящее время в коллекции отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ (г. Севастополь) представлено около 50-ти видов морских планктонных водорослей, относящихся к различным таксономическим группам. Среди них: динофитовые, диатомовые, примнезиевые, зеленые водоросли, а также цианобактерии, выделенные из планктона Черного и Средиземного морей.

Черноморские виды водорослей составляют большую часть коллекции. Проводится паспортизация этих видов. В качестве примера на сайте Института биологии южных морей (ibss.nas.gov.ua) представлен образец паспорта динофитовой водоросли *Akashiwo sanguinea* (Hirasaka) G. Hansen et Moestrup. Коллекция микроводорослей является частью общей коллекции гидробионтов Мирового океана, созданной в Институте биологии южных морей. Культуры микроводорослей успешно используют в своей экспериментальной работе сотрудники и аспиранты различных отделов Института биологии южных морей и студенты высших учебных заведений. Проявляют большой интерес к коллекционным водорослям различные научные учреждения из стран ближнего и дальнего зарубежья.

Известно, что динофитовые водоросли являются хорошим источником пищи для ракообразных, личинок рыб и моллюсков. Однако некоторые из них, представленные в коллекции, являются потенциально токсичными. К таким видам относят *P. micans* и *P. cordatum*, а также *Gymnodinium sanguineum* Hirasaka [3]. При определенных гидрохимических условиях *P. micans* способен продуцировать сакситоксины. Этот вид практически в течение всего года представлен в планктоне Черного моря и используется в пищу различными гидробионтами, в том числе моллюсками.

Ряд видов водорослей, относящихся к динофитовым, могут вызывать «цветение» воды, так называемые «красные приливы». В Черном море это явление наблюдается в северо-западной части моря и связано, чаще всего, с развитием динофитовых водорослей *P. cordatum* и *H. triquetra* [1]. Оба эти вида есть в коллекции ИнБЮМ и успешно используются молодыми коллегами в исследованиях по физиологии водорослей для того, чтобы понять, почему именно эти виды вызывают «цветение» воды.

Для многих видов морских динофитовых водорослей описана их способность к фаготрофному питанию. Исследования физиологии этих водорослей и выявление условий, при которых наблюдается не только фотосинтез, но и процесс фаготрофии, необходимы для выяснения роли таких организмов в функционировании экосистемы пелагиали Черного моря.

Среди динофитовых водорослей нашей коллекции, у которых выявлена фаготрофия, есть упомянутый выше вид *H. triquetra*. Этот вид способен питаться более крупными по размеру, чем сам, диатомовыми водорослями [10].

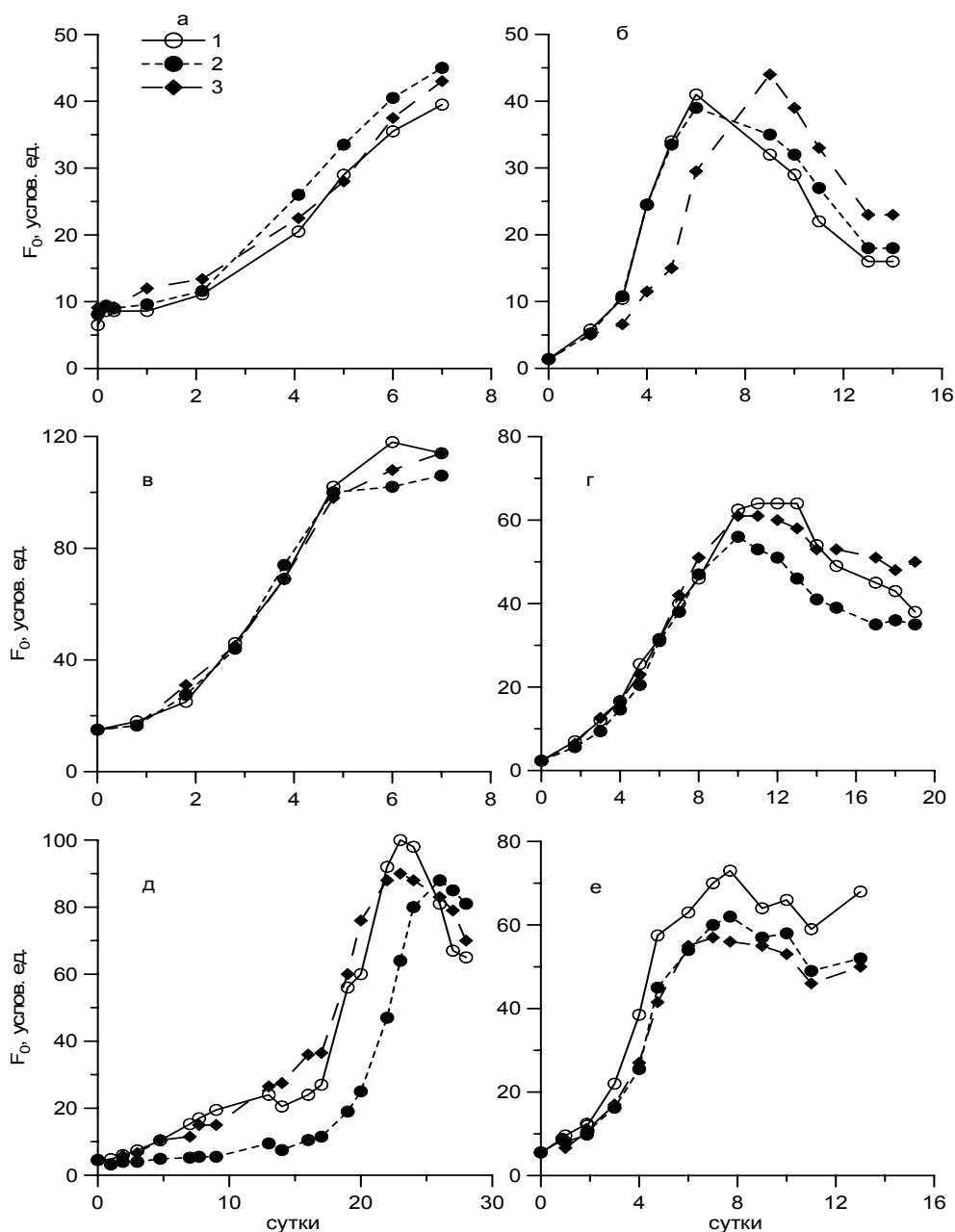


Рис. 1. Рост динофитовых водорослей на нитратах (1), аммонии (2) и мочеvine (3): *G. fissum* (а – $19 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, б – $105 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$), *P. cordatum* (в – $19 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, г – $105 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$), *H. triquetra* (д – $19 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$, е – $105 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$)

Мы надеемся, что наша коллекция привлечет еще большее внимание как молодых исследователей, так и зрелых ученых. Сотрудники отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ готовы поделиться своим опытом и знаниями, а также контактировать с коллегами, заинтересованными в проведении исследовательской работы на культурах морских планктонных водорослей.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что параметр I_k , характеризующий начало светового насыщения роста, у шести исследованных видов динофитовых водорослей изменялся в широких пределах: от $14 \text{ мкЭ} \times \text{м}^2 \times \text{с}^{-1}$ у *P. pusillum* до $73 \text{ мкЭ} \times \text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ у *P. cordatum*. Виды, обладающие разными величинами данного показателя, могут успешно развиваться в море на разных горизонтах эвфотической зоны.

2. Значения максимальной удельной скорости роста у исследованных водорослей в целом были невысокими и находились в диапазоне от 0,34 до 1,36 сутки⁻¹.

3. Область температур, в пределах которой динофитовые водоросли Черного моря способны расти, достаточно широкая: от 10 до 29 °С. Однако максимальная удельная скорость роста у отдельных видов наблюдалась при разных температурах. У *H. triquetra* максимальный рост отмечен при 19 °С, тогда как у *G. fissum* и *G. wulffii* – при 24 °С. Для остальных видов максимальная удельная скорость роста наблюдалась при 21–23 °С. Область оптимальных температур неодинакова у разных видов: наиболее низкие температуры (16–21 °С), необходимые для оптимального роста, выявлены для *H. triquetra*, а наиболее высокие (21–29 °С) – для *G. wulffii*.

4. Показана видоспецифичность динофитовых водорослей в отношении их роста на различных источниках азота. Рост *P. cordatum* в накопительной культуре на всех трех формах азота был практически одинаковым как при низкой, так и при высокой интенсивности света. Рост *G. fissum* при низкой интенсивности света был одинаковым на нитратах, аммонии и мочеvine. Тогда как при высокой освещенности рост данного вида на мочеvine был в 1,5–2 раза ниже, чем на нитратах и аммонийном азоте. Рост *H. triquetra* при низкой освещенности на аммонии был в 2–3 раза ниже по сравнению с его ростом на нитратах и мочеvine. При высокой освещенности наиболее благоприятной для роста этого вида были нитраты.

5. Отмечена важная роль коллекции морских планктонных водорослей, представленной в отделе экологической физиологии водорослей ИнБИОМ, для выполнения фундаментальных исследований и решения ряда прикладных задач.

Список литературы

1. Нестерова Д. А. «Цветение» воды в северо-западной части Черного моря (обзор) / Д. А. Нестерова // Альгология. – 2001. – Т. 11, № 4. – С. 502–513.
2. Парсонс Т. Р. Биологическая океанография / Т. Р. Парсонс, М. Такахаша, В., Харгрей. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – С. 89–91.
3. Рябушко Л. И. Потенциально опасные микроводоросли Азово-Черноморского бассейна / Л. И. Рябушко. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2003. – 288 с.
4. Стельмах Л. В. Эколого-физиологические основы биоразнообразия фитопланктона Черного моря / Л. В. Стельмах, И. М. Мансурова // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2012. – № 7. – С. 149–158.
5. Финенко З. З. Рост и скорость деления водорослей в лимитированных объемах воды / З. З. Финенко, Л. А. Ланская // Экологическая физиология морских планктонных водорослей. – Киев: Наукова думка, 1971. – С. 22–50.
6. Andersen R. A. Algal culturing techniques / R. A. Andersen. – ELSEVIERS Acad. Press, 2005. – 578 p.
7. Falkowski P. G. Growth irradiance relationships in phytoplankton / P. G. Falkowski, Z. Dubinsky, K. Wyman // Limnol. Oceanogr. – 1985. – Vol. 30. – P. 311–321.
8. Grasshoff K. Methods of seawater analysis, 2nd (ed) / K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling. – Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1983. – 419 p.
9. Guillard R. R. L. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. / R. R. L. Guillard, J. H. Ryther // Canad. J. Microbiol. – 1962. – Vol. 8. – P. 229–239.
10. Legrand C. Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra* / C. Legrand, E. Graneli, P. Carlsson // Aquat. Microb. Ecol. – 1998. – Vol. 15. – P. 65–75.
11. MacIntyre H. L. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria / H. L. MacIntyre, T. M. Kana, T. Anning // Journal of Phycology. – 2002. – Vol. 38. – P. 17–38.
12. Sosik H. M. Chlorophyll fluorescence from single cells: Interpretation of flow cytometric signals / H. M. Sosik // Limnol. Oceanogr. – 1989. – Vol. 34, N 8. – P. 1749–1761.
13. Tang, E. P. Y. Why do dinoflagellates have lower growth rates? / E. P. Y. Tang // Journal of Phycology. – 1996. – Vol. 32. – P. 80–84.

Стельмах Л. В., Мансурова И. М., Акимов А. И. Культури дінофітових водоростей Чорного моря: експериментальні дослідження та практичне значення // Екосистеми, їх оптимізація та охорона. Сімферополь: ТНУ, 2014. Вип. 11. С. 260–266.

Описана коротка історія створення найбільшої на пострадянському просторі колекції морських планктонних водоростей, серед яких значна частка видів відноситься до дінофітових. Проаналізовано результати експериментальних досліджень з оцінки впливу світла, температури і різних джерел азоту на зростання масових видів дінофітових водоростей Чорного моря. Виявлено умови, оптимальні для зростання цих видів. Обговорюється практичне значення культур морських планктонних водоростей.

Ключові слова: культури мікрободоростей, дінофітові види водоростей, Чорне море.

Stelmakh L. V., Mansurova I. M., Akimov A. I. Cultures of the Black Sea dinoflagellates: experimental studies and practical significance // Optimization and Protection of Ecosystems. Simferopol: TNU, 2014. Iss. 11. P. 260–266.

A brief history of the largest on post-Soviet space collection of marine planktonic algae is presented. A large proportion of species refers to the dinoflagellate. The results of experimental studies have shown the effect of light, temperature and various nitrogen sources on the growth of mass species of dinoflagellates of the Black Sea. The optimal conditions for the growth of these species were defined. We discuss the practical importance of marine planktonic algae cultures.

Key words: culture of microalgae, dinoflagellate algae species, the Black Sea.

Поступила в редакцію 08.02.2014 г.