

УДК 582.273–152.24

Н.А. Айздайчер, И.В. Стоник, Ж.В. Маркина*

Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17**АДАПТИВНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОСКОПИЧЕСКОЙ
КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM*
(ШТАММ PP-AB11) ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СОЛЕНОСТИ СРЕДЫ**

Изучены адаптивные возможности штамма PP-AB11 красной водоросли *Porphyridium purpureum*, впервые изолированного из северо-западной части Японского моря. Установлено, что при солености 8 ‰ в течение четырех суток рост водоросли ингибировался, скорость роста составляла 0,1 деления в сутки. Морфологических отличий клеток по сравнению с контролем не установлено, средний размер их был как в контроле ($6,3 \pm 1,2$ мкм). В конце первого этапа (через 21 сут) численность клеток увеличилась до 85 % от контроля. Понижение солености до 4 ‰ вызывало четырехсуточную лаг-фазу, средний размер клеток увеличился до $7,8 \pm 1,5$ мкм. В клетках отмечали ретракцию цитоплазмы, хлоропласты сжимались и становились зернистыми. В конце опыта общая численность клеток составляла 53 % от контроля. Более существенные изменения происходили при солености 2 ‰: через четверо суток в суспензии оставалось 6 % жизнеспособных клеток. За счет гидратации их размер возрастал до $8,7 \pm 1,6$ мкм, хлоропласты были зернистыми, цитоплазма уплотненной, темной. В пресной воде (0 ‰) водоросли погибали полностью через четверо суток. На втором этапе было показано, что через 21 сут происходила полноценная адаптация водоросли к солености 8 ‰ и общая численность достигала 97 % от контроля. При 4 ‰ скорость роста после адаптации составляла 0,5 деления в сутки, и общая численность клеток достигала 84 %. Морфологических отличий клеток от контроля не отмечали, восстанавливались хлоропласты и их размер. Показано, что водоросли способны адаптироваться и к солености 2 ‰, однако из-за более серьезных повреждений клеток скорость роста в конце второго этапа была несколько ниже, чем в контроле, морфология клеток полностью восстанавливалась. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при пересеве адаптированной к 2 ‰ культуры в среду соленостью 32 ‰, при этом не зафиксировано никаких отличий в скорости роста, морфологии по сравнению с контролем.

Ключевые слова: красная микроводоросль, численность клеток, адаптация, соленость, скорость роста, *Porphyridium purpureum*.

Aizdaicher N.A., Stonik I.V., Markina Zh.V. Adaptive abilities of microscopic red alga *Porphyridium purpureum* (strain PP-AB11) under change of salinity in the medium // Izv. TINRO. — 2016. — Vol. 186. — P. 157–162.

* Айздайчер Нина Александровна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, e-mail: aizdaicher@mail.ru; Стоник Инна Валентиновна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: innast2004@mail.ru; Маркина Жанна Васильевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: zhannav@mail.ru.

Aizdaicher Nina A., Ph.D., assistant professor, senior researcher, e-mail: aizdaicher@mail.ru; Stonik Inna V., Ph.D., senior researcher, e-mail: innast2004@mail.ru; Markina Zhanna V., Ph.D., researcher, e-mail: zhannav@mail.ru.

Adaptive abilities of the microscopic red alga *Porphyridium purpureum* (strain PP-AB11, isolated from the northwestern Japan Sea) are investigated experimentally by its repeated cultivation under various water salinity. Under the salinity of 8 ‰, the growth of *P. purpureum* was inhibited (0.1 division/day) during the first four days though there were no morphological differences of the cells as compared with those in the control (mean cell size was $6.3 \pm 1.2 \mu\text{m}$ in both cases); the cell density increased to 85 % of the control value after 21 days exposure. Under the salinity of 4 ‰, the lag-phase was also 4 days but size of the cells increased (on average up to $7.8 \pm 1.5 \mu\text{m}$), the cell morphology changed including the cytoplasm retraction, and contraction and granulation of the chloroplasts; the cell density increased less (to 53 % of the control value) after 21 days exposure. Under the salinity of 2 ‰, changes of the cell morphology and density were the most prominent: density of viable cells decreased to 6 % of the control value after 4-days exposure, size of the cells increased on average up to $8.7 \pm 1.6 \mu\text{m}$ due to hydration, granulation was noticed in the chloroplasts, and the cytoplasm became dense. Under the salinity of 0 ‰, all the cells died after 4 days. Being cultivated repeatedly, the alga was better adapted to low salinity: after 21-days exposure the cell density was 97 % of the control value under salinity of 8 ‰ and 84 % of the control value under salinity of 4 ‰, with the growth rate 0.5 divisions/day and without visible morphological differences of the cells as compared with those in the control. It was adapted even to salinity of 2 ‰: the cells morphology was restored though the growth rate after 21-days exposition was still lower than in the control because of serious deterioration of the cells. The growth rate and cell morphology did not significantly differ from the control after reinoculation of the culture, previously adapted to salinity of 2 ‰, into the medium with salinity of 32 ‰.

Key words: red microalga, cell density, adaptation, salinity, growth rate, *Porphyridium purpureum*.

Введение

В водных экосистемах одноклеточные водоросли являются основными продуцентами органического вещества и именно им принадлежит доминирующая роль в формировании первичной продукции (Саут, Уиттик, 1990). Благодаря высокому содержанию в них полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), которые синтезируются только микроводорослями, они служат незаменимой кормовой базой для потребляющих их рыб, беспозвоночных и оседающей молодежи. В марикультурных хозяйствах микроводоросли рассматриваются как оптимальный корм для разводимых ракообразных, рыб и моллюсков (Jiang et al., 1999). Так, некоторые ПНЖК без изменений аккумулируются устрицами из корма (*Skeletonema costatum*), что значительно улучшает рост моллюсков и качество конечного продукта (Piveteau et al., 2000). В последнее время существенно возрос интерес к пигментам микроводорослей из-за их высокой антиоксидантной активности (Корецкы et al., 2002; Kathiresan et al., 2006; Финенко и др., 2008; Гудвиллович, 2010; Гудвиллович, Боровков, 2014).

Введение в культуру видов микроводорослей, изолированных из прибрежных вод дальневосточных морей России, имеет большое прикладное значение как потенциальный ресурс биологического сырья для производства ценных веществ. Штамм *Porphyridium purpureum* PP-AB11 — единственный штамм красных водорослей из северо-западной части Японского моря. Его идентификация подтверждена данными генетического анализа и электронной микроскопии (Ефимова и др., 2014). Установлено, что нижняя граница толерантного диапазона этого штамма соответствует 12 ‰ (Айздайчер и др., 2014).

Цель данного исследования состояла в рассмотрении и описании адаптивных возможностей *P. purpureum* (штамма PP-AB11) из северо-западной части Японского моря к длительному воздействию опреснения ниже установленного толерантного диапазона.

Материалы и методы

Материалом для работы послужила альгологически чистая культура *P. purpureum* (Bory de Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 (Rhodophyta), изолированная из северо-западной части Японского моря и поддерживаемая в коллекции Института биологии моря ДВО РАН. Культуру водоросли выращивали в конических колбах Эрленмейера

на среде *f* (Guillard, 1975) при температуре 19–20 °С, освещении люминесцентными лампами интенсивностью 3500 лк со свето-темновым периодом 14 ч свет : 10 ч темнота. Питательную среду готовили на основе природной морской воды. Для получения синхронной культуры такой режим был в течение всего эксперимента (Fabregas et al., 1985). Маточную культуру в жизнеспособном состоянии сохраняли путем пересевов на свежую питательную среду.

В связи с тем что ранее (Айздайчер и др., 2014) была установлена нижняя граница толерантного диапазона (12 ‰), адаптивные возможности водоросли исследовали при солености 8, 4, 2 и 0 ‰. За контроль принимали рост водорослей при солености 32 ‰, т.е. близкой к таковой из места обитания выделенного в культуру вида. Пониженную соленость получали разведением морской воды дистиллированной (Fu, Bell, 2003). Соленость измеряли на солемере ГМ-65М. Культуру в опытах брали в экспоненциальной стадии роста.

Эксперимент проводили в два этапа. На первом этапе в колбы помещали 100 мл питательной среды, приготовленной на воде необходимой солености, и вносили инокулят с таким расчетом, чтобы стартовая концентрация составляла $4 \cdot 10^4$ кл./мл. На втором этапе водоросли, экспонируемые при разной солености, переносили в соответствующую соленость. Кроме того, после 21 сут выращивания водоросли на первом этапе при солености 2 ‰ суспензию клеток на втором этапе переносили в среду соленостью 32 ‰. Для этого клетки осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, супернатант сливали, клетки помещали в колбы со 100 мл питательной среды соответствующей солености и экспонировали в стандартных условиях. Стартовая концентрация была такая, как на первом этапе. Пробы отбирали после тщательного перемешивания в одно и то же время через 4, 7, 11, 14, 18 и 21 сут.

Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева, используя микроскоп Janamed 2. Средний размер рассчитывали после измерения 30 кл. при каждой солености. Скорость роста вычисляли в начале и конце экспоненциальной стадии роста по формуле (Brown et al., 1998):

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t_t - t_0),$$

где $\ln N_0$ и $\ln N_t$ — логарифм численности клеток к моменту времени t_0 и t_t ; t — время, сут.

Среднее время генерации рассчитывали по формуле (Jones et al., 1963):

$$t_g = \ln 2 / \mu = 0,693 / \mu,$$

где t_g — время генерации, ч; μ — скорость роста, $0,693 = \ln 2$.

Эксперименты, представленные в работе, проводили в трех повторностях. При статистической обработке данных использовали программу Excel.

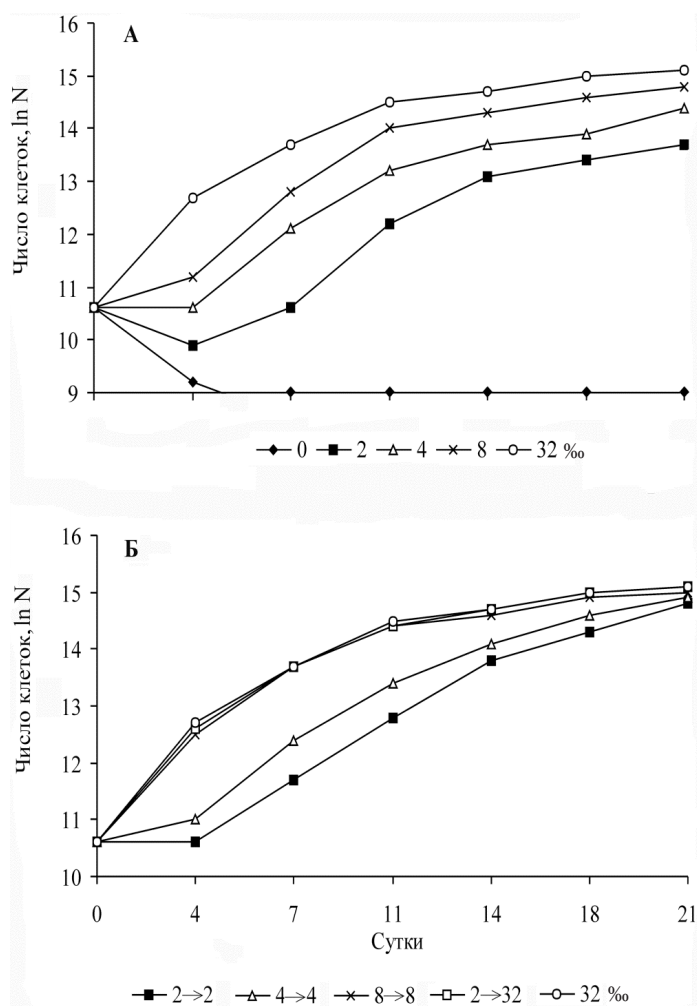
Результаты и их обсуждение

Как показали данные, полученные в ходе первого этапа, при выращивании *P. purpureum* в среде соленостью 8 ‰ численность клеток в течение четырех суток составляла 25 % от контроля (см. рисунок, А).

Скорость роста ограничивалась 0,1 деления в сутки и, соответственно, высоким значением времени генерации (см. таблицу).

В дальнейшем через семь суток наблюдали интенсивное деление клеток водоросли, скорость роста увеличивалась до 0,5 деления, а время генерации сокращалось до 34 ч. В данном случае не отмечено никаких морфологических изменений клеток. Средний размер был как в контроле ($6,3 \pm 1,2$ мкм).

Понижение солености до 4 ‰ сказывалось на всех показателях: деления клеток в течение четырех суток не было, поэтому численность клеток оставалась на уровне контроля (см. рисунок, А). Средний размер клеток за счет гидратации увеличивался до $7,8 \pm 1,5$ мкм. В отдельных клетках отмечали ретракцию цитоплазмы, хлоропласты сжимались и становились зернистыми. Через семь суток экспозиции скорость роста увеличивалась, время генерации — 34 ч (см. таблицу). У основной части клеток их размер восстанавливался до контрольных значений, зернистость в хлоропластах оста-



Динамика численности клеток (lnN) *P. purpureum* (штамм PP-AB11) в зависимости от солености среды: **А** — первый этап; **Б** — второй этап

Dynamics of cell density (ln N) for *P. purpureum* (strain PP-AB11) under various water salinity: **А** — the first cultivation; **Б** — the second cultivation

Скорость роста (число делений/сут) и время генерации (ч) *P. purpureum* (штамм PP-AB11) в зависимости от солености среды

Growth rate (divisions per day) and generation time (hour) of *P. purpureum* (strain PP-AB11) under various water salinity

Экспозиция, сут	Первый этап					Второй этап			
	32 ‰ Контроль	8 ‰	4 ‰	2 ‰	0 ‰	8→8	4→4	2→2	2→32 ‰
4	$\frac{0.5}{31}$	$\frac{0.1}{165}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0.5}{34}$	$\frac{0.1}{165}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0.5}{34}$
7	$\frac{0.3}{55}$	$\frac{0.5}{34}$	$\frac{0.5}{34}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{0.4}{41}$	$\frac{0.5}{34}$	$\frac{0.4}{41}$	$\frac{0.4}{41}$

Примечание. В числителе даны значения скорости роста, в знаменателе — время генерации.

валась лишь у незначительной части. Общая их численность в конце опыта была ниже, чем в контроле, что, возможно, связано с продолжительной лаг-фазой.

С понижением солености до 2 ‰ существенно сокращалась жизнеспособность клеток порфиридиума. Через четверо суток в суспензии оставалось 6 % жизнеспособных клеток (см. рисунок, А). Средний размер клеток увеличивался до $8,7 \pm 1,6$ мкм.

Хлоропласты зернистые, деформированные, цитоплазма уплотненная и темная. Отмеченные морфологические изменения сохранялись в течение 18 сут. При увеличении экспозиции до 21 сут культура после адаптации восстанавливалась, скорость роста увеличивалась и сокращалось время генерации (см. таблицу); к концу опыта численность достигала 25 % от контроля. В пресной воде (соленость 0 ‰) через четверо суток культура полностью погибала.

Подавление роста при значительном понижении солености, возможно, обусловлено не столько повреждающим действием этого фактора, сколько перестройками в клетках водорослей. Медленный рост при стрессовых условиях позволяет им выживать, сохраняя ресурсы, необходимые для защиты от повреждающего фактора, и при этом запускаются процессы для адаптивных перестроек (Гапочка, 1981). Известно, что в угнетенном состоянии необходимую для жизнедеятельности энергию водоросли получают из внутренних резервов в результате повышения активности гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов (Pal et al., 2013). Высокая устойчивость порфиридиума к значительному понижению солености, по-видимому, является его видоспецифической особенностью. Известно, что клетки этой водоросли способны синтезировать гелеобразующие полисахариды и в результате, кроме целлюлозной оболочки, клетка окружена слизистым полисахаридным чехлом (Гудвилович, 2010; Ефимова и др., 2014). В данных условиях на дне колбы образуются агрегаты из большого количества клеток. Образование таких скоплений, вероятно, можно рассматривать как определенную защитную реакцию организма на повреждающее действие фактора (Саут, Уиттик, 1990).

На втором этапе для оценки адаптивных возможностей клеток порфиридиума, росших при разной солености, их отмывали стерилизованной морской водой соответствующей солености и переносили в среду необходимой солености. Кроме того, клетки, культивируемые в течение 21 сут при солености 2 ‰, переносили в среду соленостью 32 ‰. Как показали полученные на втором этапе результаты исследований, динамика численности клеток порфиридиума после пересева из солености 8 ‰ в такую же и из 2 ‰ в соленость 32 ‰ в течение опыта была как в контроле (см. рисунок, Б). При пересеве из 4 ‰ в такую же соленость на протяжении четырех суток деление клеток было замедленным, и скорость роста составляла 0,1 деления в сутки (см. таблицу). После адаптации скорость роста повышалась до 0,5 деления в сутки, а время генерации сокращалось до 34 ч. Общая численность клеток в конце опыта составляла 84 % от контроля, морфологических отличий клеток по сравнению с контролем не отмечали, хлоропласты полностью расправлялись, зернистость исчезала, размер клеток не отличался от контроля. При более низкой солености (2 ‰) лаг-фаза продолжалась четверо суток. При увеличении экспозиции клетки начинали активно размножаться, и скорость роста составляла 0,4 деления. В конце опыта общая численность клеток составляла 78 % от контроля. Размер клеток восстанавливался до контрольных значений, хлоропласты утрачивали зернистость. В результате адаптации клетки порфиридиума свободно распределялись в суспензии, не образуя агрегатов.

Жизнедеятельность морских микроводорослей в значительной степени регулируется влиянием абиотических факторов, одним из которых является соленость морской воды. Верхняя граница значения солености для обитающих в прибрежных акваториях организмов определена особенностями гидрохимического режима района. Вопрос же о нижней допустимой границе солености морской воды для многих микроводорослей остается открытым. Полноценное развитие водорослей происходит тогда, когда они обладают необходимым запасом экологической пластичности, позволяющей им переносить изменение солености внешней среды. Функционирование водорослей в прибрежной зоне возможно лишь благодаря выработке определенных адаптаций к изменению солености (Гапочка, 1981). Согласно работам В.В. Хлебовича (1974), адаптация организма состоялась в том случае, когда он способен выжить в новых для него условиях.

Выводы

Установлено, что *P. purpureum* (штамм PP-AB11) обладает исключительно высокой экологической пластичностью. Полноценная адаптация водоросли к солености 8 ‰ происходила через 25 сут, при этом не выявлено морфологических отличий от контроля.

Понижение солености до 4 ‰ приводило к более длительному периоду адаптации: в этом случае в начале опыта отмечены увеличение размера клеток за счет гидратации, зернистость хлоропластов и ретракция цитоплазмы.

Чрезвычайно высокая толерантность *P. purpureum* к изменению исследуемого фактора способствовала его адаптации к солености 2 ‰: при этом восстанавливались морфологические признаки клеток. В результате после пересева водоросли из среды с соленостью 2 ‰ в 32 ‰ не зафиксировано изменений в скорости роста и морфологии по сравнению с контролем.

Список литературы

Айздайчер Н.А., Стоник И.В., Борода А.В. Развитие *Porphyridium purpureum* (Bory De Saint-Vincent) Drew et Ross (Rhodophyta) из Амурского залива Японского моря в лабораторной культуре // Биол. моря. — 2014. — Т. 40, № 5. — С. 384–390.

Гапочка Л.Д. Об адаптации водорослей : моногр. — М. : МГУ, 1981. — 80 с.

Гудвилович И.Н. Влияние условий культивирования на рост и содержание фикобилипротеинов красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (обзор) // Экология моря. — 2010. — Спец. вып. № 81 : Биотехнология водорослей. — С. 28–36.

Гудвилович И.Н., Боровков А.Б. Продукционные характеристики *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры // Альгология. — 2014. — Т. 24, № 1. — С. 34–46.

Ефимова К.В., Крещеновская М.А., Айздайчер Н.А. и др. Генетическое и ультраструктурное исследование трех клонов *Porphyridium purpureum* (Bory De Saint-Vincent, 1797) Drew et Ross, 1965 (Rhodophyta) из коллекции морских микроводорослей Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН // Биол. моря. — 2014. — Т. 40, № 1. — С. 373–383.

Саут Р., Уиттик А. Основы альгологии : моногр. — М. : Мир, 1990. — 597 с.

Финенко З.З., Чурилова Т.Я., Акимов А.И. Пигменты микроводорослей // Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. — Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. — С. 301–319.

Хлебович В.В. Критическая соленость биологических процессов : моногр. — Л. : Наука, 1974. — 236 с.

Brown M.R., McCausland M.A., Kowalski K. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat // Aquaculture. — 1998. — Vol. 165. — P. 281–295.

Fabregas J., Herrero C., Abalde J. et al. Growth, chlorophyll *a* and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and high nutrient concentrations // Aquaculture. — 1985. — Vol. 50. — P. 1–11.

Fu F., Bell P.R.F. Effect of salinity on growth, pigmentation, NO₃ fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. // Mar. Ecol. Prog. Ser. — 2003. — Vol. 257. — P. 69–76.

Guillard R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates // Culture of marine invertebrate animals / eds W.L. Smith, M.H. Chanley. — N.Y. : Plenum Press, 1975. — P. 26–60.

Jiang Y., Chen F., Liang S.-Z. Production potential of docosaheptaenoic acid by the heterotrophic marine dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* // Proc. Diochem. — 1999. — Vol. 34. — P. 633–637.

Jones R.F., Speen H.L., Kury W. Studies on the growth of the red alga *Porphyridium cruentum* // Physiol. Plant. — 1963. — Vol. 16. — P. 636–643.

Kathiresan S., Sarada R., Bhattacharya S. et al. Culture media optimization for growth and phycoeritrin production from *Porphyridium purpureum* // Biotech. and Bioengin. — 2006. — Vol. 96. — P. 456–463.

Kopecky J., Riederer M., Pfuendel E. *Porphyridium purpureum* (formerly *P. cruentum*) contains beta-carotene but no alpha-carotene // Arch. Hydrobiol. (Suppl.) (Algol. Stud.). — 2002. — Vol. 142. — P. 189–195.

Pal D., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohenet S. et al. Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCLA 804 in response to osmotic downshift // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2013. — Vol. 97. — P. 8291–8306.

Piveteau F., Baud J.P., Demaimay M. Variation of fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured with a new procedure using *Skeletonema costatum* // Mar. Lipids. — 2000. — № 27. — P. 183.

Поступила в редакцию 25.05.16 г.