УДК 639.4.09:582.261

Н.А. Айздайчер, Ж.В. Маркина*Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17**ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ МЕРЫ БОРЬБЫ С ВРЕДОНОСНОЙ
ВОДОРΟΣЛЬЮ *PSEUDO-NITZSCHIA CALLIANTHA*
В МАРИКУЛЬТУРНЫХ ХОЗЯЙСТВАХ**

В лабораторной культуре изучена динамика роста потенциально токсичной диатомовой микроводоросли *Pseudo-nitzschia calliantha* при разных условиях выращивания. Установлено, что в условиях без перемешивания через трое суток экспозиции отмечался пик численности, когда концентрация достигала 16131 клетки в 1 мл. В этот период в суспензии присутствовала значительная доля цепочек, состоящих из 5–8 клеток. Динамика роста культуры при увеличении экспозиции носила пульсирующий характер; в суспензии преобладали цепочки из 5–12 клеток. Хлоропласты в клетках были хорошо развиты, оливкового цвета. В том случае, когда суспензию во время выращивания ежедневно перемешивали, в динамике роста наблюдалась короткая лаг-фаза, после которой наступала экспоненциальная фаза роста, в течение которой клетки начинали активно делиться. За весь период эксперимента зафиксировано три пика численности с концентрацией клеток от 59828 до 70566 в 1 мл. В суспензии отмечали цепочки из 2–8 клеток, а при увеличении экспозиции оставались только одиночные клетки, быстро оседающие на дно сосуда. Хлоропласты были прерывистыми и обесцвеченными, что свидетельствовало об отмирании культуры. В связи с тем что *P. calliantha* является потенциально токсичным видом, в целях предупреждения накопления выделяемых водорослью токсинов в среде рекомендовано выбирать места для марикультурных хозяйств с хорошей циркуляцией водных масс или использовать установки для активного перемешивания воды.

Ключевые слова: *Pseudo-nitzschia calliantha*, динамика роста, численность клеток, фикотоксины, предотвращение красных приливов.

Aizdaicher N.A., Markina Zh.V. Suppositional measures for harmful microalga *Pseudo-nitzschia calliantha* control in aquaculture farms // Izv. TINRO. — 2015. — Vol. 183. — P. 236–241.

Growth of potentially toxic diatom microalga *Pseudo-nitzschia calliantha* is investigated in laboratory culture under different conditions of cultivation. In the conditions without stirring, the highest abundance of algae was moderate (16131 cells/ml) and observed after 3 days of exposition; many chains of 5–8 cells were formed. Further exposition showed cyclic dynamics of the culture, the chains of 5–12 cells were numerous, chloroplasts looked healthy, their color was olive-green. After stirring, a short lag-phase preceded to the phase of active cells dividing with exponential growth of their number to the peaks of 59828–70566 cells/ml, chains of 2–8 cells were formed but rapidly settled to the vessel bottom, chloroplasts were discrete and bleached that indicated dying of the culture. *P. calliantha* is potentially toxic species, so the sites

* Айздайчер Нина Александровна, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru; Маркина Жанна Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник, e-mail: zhannav@mail.ru.

Aizdaicher Nina A., Ph.D., assistant professor, senior researcher, e-mail: inmarbio@mail.primorye.ru; Markina Zh.V., Ph.D., researcher, e-mail: zhannav@mail.ru.

with active water circulation or constrained water mixing are recommended for aquaculture farming that protects the environments from its phycotoxins accumulation.

Key words: *Pseudo-nitzschia calliantha*, growth dynamics, cells number, phycotoxin, red tide.

Введение

Интенсивная антропогенная деятельность, вызывающая ухудшение качества воды, является общепризнанной реальностью настоящего времени. Неконтролируемый сброс неочищенных или недостаточно очищенных сточных вод вызывает загрязнение многих прибрежных акваторий дальневосточных морей, что может привести к их эвтрофикации. Фотосинтезирующие организмы, в частности микроводоросли, — главные поставщики метаболитов в морскую воду, выделяющие более 50 % органического вещества, синтезированного ими (Хайлов, 1971). Кроме того, они являются основной кормовой базой для многих гидробионтов и их личинок. Однако не менее важную отрицательную роль в экосистемах играют вредоносные микроводоросли, которые все чаще регистрируют в водах российского побережья дальневосточных морей (Orlova et al., 2014). В результате мониторинга выявлено 15 видов микроводорослей, известных как потенциально токсичные (Морозова, Орлова, 2005).

В свете новых данных роль динофитовых водорослей как основных вредоносных организмов ставится под сомнение. В конце прошлого века впервые было обнаружено «цветение» диатомовой водоросли *Pseudo-nitzschia pungens*. Представители рода *Pseudo-nitzschia* — многочисленная группа планктонных организмов, продуцирующих токсины. По морфологическим признакам многие виды этого рода довольно близки и их идентификация связана с определенными трудностями, которые предусматривают проведение экспериментальных исследований на альгологически чистых лабораторных культурах для четкого определения их таксономического статуса и более полного понимания вопросов биологии и экологии.

Интенсивное развитие водорослей рода *Pseudo-nitzschia* в дальневосточных морях России наблюдается в начале лета и осенью (Стоник, Орлова, 2007; Stonik et al., 2008). Изучение массовых видов микроводорослей в условиях лабораторной культуры позволяет объяснить механизмы их развития и разработать меры борьбы с этим явлением. В связи с этим цель данной работы заключалась в исследовании влияния перемешивания воды на рост и поведение популяции потенциально токсичной водоросли *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Maestrup et Hasle в условиях лабораторной культуры.

Материалы и методы

Объектом исследования служила потенциально токсичная диатомовая водоросль *Pseudo-nitzschia calliantha*. Это планктонный колониальный вид, колонии которого представлены длинными цепочками, состоящими из прочно соединенных клеток линейно-ланцетной формы с заостренными концами (рис. 1).

Число клеток в цепочках варьирует от 2 до 16, реже 26 (Стоник, Орлова, 2007). Для получения альгологически чистой культуры *P. calliantha* отдельные цепочки отбирали под бинокулярным микроскопом капиллярной пипеткой и переносили в чашки Петри со стерильной питательной средой *f* (Guillard, 1975). Несколько минут цепочки отмывали от сопутствующих микроводорослей, вновь переносили в чашки Петри с питательной средой и экспонировали при освещенности 3000 лк люминесцентными лампами со свето-темновым периодом 12 ч при температуре 18 ± 2 °C в течение 3–4 суток. Затем чашки просматривали под микроскопом. В том случае если в среде была монокультура водоросли, суспензию переносили в конические колбы Эрленмейера вместимостью 100 мл с объемом питательной среды 70 мл; по мере нарастания числа клеток в суспензии объем среды постепенно увеличивали.

Для исследования влияния разных условий выращивания на динамику численности клеток и длину цепочек водоросли культивировали в колбах Эрленмейера вместимостью 2000 мл с объемом суспензии 1750 мл. Для этого в питательную среду

вносили маточную культуру водоросли, взятую на экспоненциальной стадии роста с таким расчетом, чтобы стартовая концентрация в опытных сосудах была 1950 клеток в 1 мл. Опытные колбы экспонировали в стандартных условиях.

Рис. 1. Внешний вид клеток *P. calliantha* в культуре

Fig. 1. *Pseudo-nitzschia calliantha* cells in culture

Поставлены две серии экспериментов (каждая серия в двух повторностях): в первой серии (культура № 1) суспензию не перемешивали и пробы для подсчета количества клеток отбирали пипеткой с разных горизонтов (у поверхности, в середине суспензии и у дна). Отобранные пробы тщательно перемешивали и подсчитывали число клеток в 1 мл и их количество в цепочке. Во второй серии (культура № 2) суспензию ежедневно тщательно перемешивали, отбирали пробу для подсчета клеток и их количества в цепочках.

Для более наглядного представления материала цепочки, состоящие из разного количества клеток, объединяли в группы: I — цепочки из 2–4 клеток; II — из 5–8 клеток; III — из 9–12 клеток и IV — из 13–16 клеток — и выражали в процентах от общего числа клеток. Количество клеток подсчитывали в камере типа Ножотта объемом 0,044 мл. Продолжительность опытов — 45 (культура без перемешивания) и 23 суток (культура с перемешиванием).

Результаты и их обсуждение

Рост водоросли *P. calliantha* в накопительной культуре описывается типичной s-образной кривой, характерной для всех клеточных культур (Печуркин, Терсков, 1975). В первой серии опыта (культура № 1) суспензию не перемешивали. В этих условиях наблюдали двухдневную лаг-фазу, когда деление клеток не зафиксировано (рис. 2).

В суспензии преобладали колонии из первой группы, состоящие из 1–4 клеток (рис. 3, А).

Затем клетки начинали активно делиться, и через трое суток отмечали пик численности, когда концентрация достигала 16131 клетки в 1 мл. В этот период в суспензии наряду с цепочками из I группы наблюдали значительную долю колоний из II группы и небольшую из III группы. В целом рост культуры при продолжительной экспозиции носил пульсирующий характер. В период, когда число клеток в суспензии было незначительным, в ней преобладали цепочки из I группы. С увеличением экспозиции и до конца эксперимента преобладали цепочки из II и III групп с небольшой долей колоний из IV группы (рис. 3, А). До конца эксперимента (до 45 суток) хлоропласты в клетках были хорошо выражены, оливкового цвета.

В опыте с перемешиванием (культура № 2) после короткой лаг-фазы клетки начинали активно размножаться и суспензия переходила в экспоненциальную стадию роста, которая продолжалась в течение пяти суток (рис. 2). За весь период экспозиции отмечали три ярко выраженных пика численности с концентрацией клеток от 59828

Рис. 2. Кривая роста *P. calliantha* в культуре без перемешивания (№ 1) и с перемешиванием (№ 2)

Fig. 2. *Pseudo-nitzschia calliantha* growth curves in the culture without stirring (№ 1) and with stirring (№ 2)

Рис. 3. Доли цепочек с разным числом клеток в их общем количестве в культуре без перемешивания (А) и с перемешиванием (Б)

Fig. 3. Percentage of chains with certain cells number to their total number for the culture without stirring (А) and with stirring (Б)

до 70566 в 1 мл. В течение трех суток суспензия была представлена в основном колониями из I и II групп и незначительной долей цепочек III и IV групп (рис. 3, Б). При увеличении экспозиции в суспензии оставались только цепочки из I группы, а к концу эксперимента (в этом случае он продолжался 23 дня) преобладали преимущественно одиночные клетки, которые быстро оседали на дно сосуда. Хлоропласты в клетках были прерывистыми, точечными и обесцвеченными, что свидетельствовало об отмирании культуры.

В природных условиях на первом месте при возникновении красных приливов выступают физические факторы, главный из которых — стабилизация водных масс в условиях слабой турбулентности (Sorokin, Konovalova, 1973). Ухудшение качества морской воды также считается возможной причиной расширения территории и продолжительности красных приливов. При этих условиях водоросли размножаются в течение длительного времени, что способствует их локальной концентрации. При длительных застойных явлениях популяция микроводорослей может вегетировать достаточно долгое время, и в этом случае содержание токсинов возрастает. Экспериментально было показано, что наибольшее количество домоевой кислоты накапливалось в 27-дневной культуре и токсичность среды резко повышалась (Orlova et al., 2008).

Таким образом, полученные нами результаты показали, что перемешивание суспензии во время роста культуры в лабораторных условиях способствовало более интенсивному делению клеток в период экспоненциального роста и быстрому их отмиранию после достижения максимальной плотности. Перемешивание суспензии сказывалось и на длине цепочек: доля коротких цепочек преобладала в течение всего эксперимента. В том случае когда культуру не перемешивали, нарастание количества клеток было не таким интенсивным, развитие сопровождалось несколькими пиками численности. Доля длинных цепочек в этом случае преобладала, и условия способствовали их формированию до конца эксперимента. Следовательно, при быстром отмирании водорослей токсичные вещества в среде не накапливаются.

В связи с этим при организации марикультурных хозяйств необходимо принимать во внимание особенности экологии токсичных микроводорослей. Возможными путями решения проблемы «цветения» могут быть такие меры, как расположение марикультурных хозяйств в акваториях с активной циркуляцией водных масс, а также применение установок для обеспечения перемешивания воды. Последний прием является наиболее эффективным (Hallegraef et al., 2004).

В странах с хорошо развитой марикультурной индустрией интенсивно разрабатываются методы борьбы с красными приливами. В их число входят разнообразные приемы: мониторинг мест размещения плантаций марикультуры, заглубление садков в период «цветения» водорослей, использование для аэрации садков глубинной воды, расположение садков в турбулентных зонах (Murakami, 1988; Hallegraef et al., 2004). В Республике Корея во время красных приливов широко используется распыление желтой глины. Разбрызгивание водного раствора глины приводит к разрушению клеток водорослей и образованию хлопьев. Хлопья вместе с разрушенными клетками оседают на дно, при этом уменьшается их концентрация в планктоне и воздействие вредных веществ на животных и человека предотвращается (Yu et al., 2004; Seo et al., 2008).

Заключение

В результате проведенных исследований показано, что в культуре без перемешивания через трое суток отмечали максимальную численность клеток *P. calliantha*; при продолжительной экспозиции рост культуры характеризовался ее небольшими колебаниями. В начале эксперимента в суспензии встречались цепочки из всех групп, а по мере увеличения срока культивирования преобладали цепочки из II группы; увеличивалось их число из III и IV групп. Хлоропласты к концу эксперимента оставались хорошо развитыми, оливкового цвета.

В культуре с перемешиванием происходило интенсивное деление клеток, и за период культивирования отмечали три ярко выраженных пика численности, а затем

быстрое отмирание клеток после 23-суточной экспозиции. В суспензии в течение трех суток присутствовали цепочки из I и II групп и незначительное число цепочек из III и IV групп. По мере увеличения экспозиции суспензия была представлена короткими цепочками из I группы, которые быстро опускались на дно колбы. Хлоропласты были в основном сжатыми и обесцвеченными.

В качестве мер, предупреждающих развитие красных приливов, рекомендовано размещение марикультурных плантаций в акваториях с хорошей циркуляцией водных масс и использование установок для перемешивания воды.

Авторы выражают глубокую признательность ст. н. с. Института биологии моря ДВО РАН, канд. биол. наук И.В. Стоник за идентификацию объекта.

Список литературы

Морозова Т.В., Орлова Т.Ю. Мониторинг фитопланктона в районе хозяйств марикультуры в заливе Восток Японского моря // Биол. моря. — 2005. — Т. 31, № 1. — С. 11–16.

Печуркин Н.С., Терсков И.А. Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций (в управляемых условиях) : моногр. — Новосибирск : Наука, 1975. — 216 с.

Стоник И.В., Орлова Т.Ю. Виды рода *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta), доминирующие в летне-осеннем планктоне в заливе Анива (Охотское море) // Ботан. журн. — 2007. — Т. 92, № 11. — С. 1656–1663.

Хайлов К.М. Экологический метаболизм в море : моногр. — Киев : Наук. думка, 1971. — 252 с.

Guillard R.R.L. Culture of phytoplankton of feeding marine invertebrates // Culture of marine invertebrate animals. — N.Y. : Plenum Press, 1975. — P. 26–60.

Hallegraef G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. Manual on Harmful Marine Microalgae — Paris : UNESCO Publishing, 2004. — 793 p.

Murakami A. Occurrence and Control of Red Tide // Bull. Soc. Sea Water Sci. — 1988. — Vol. 42. — P. 125–133.

Orlova T.Yu., Morozova T.V., Kameneva P.M., Shevchenko O.G. Harmful algal blooms on the Russian east coast and their possible economic impacts // Proceeding of the Workshop Economic Impacts of Harmful algae blooms of Fisheries and Aquaculture / ed. by V.L. Trainer, T. Yoshida. — North Pacific marine Science organization : Pices Scientific Report, 2014. — P. 41–58.

Orlova T.Yu., Stonik I.V., Aizdaicher N.A. et al. Toxicity, morphology and distribution of *Pseudo-nitzschia calliantha*, *P. multistriata* and *P. multiseries* (Bacillariophyta) from the northwestern Sea of Japan // Botanica marina. — 2008. — Vol. 51. — P. 297–306.

Seo K.S., Lee C.K., Park Y.T., Lee Y. Effect of yellow clay on respiration and phytoplankton uptake of bivalves // Fish. Sci. — 2008. — Vol. 74. — P. 120–127.

Sorokin Yu.I., Konovalova G.V. Production and decomposition of organic matter in bay of the sea of Japan during the winter diatom bloom // Limnol. Oceanogr. — 1973. — Vol. 18. — P. 962–967.

Stonik I.V., Orlova T.Yu., Begun A.A. Potentially toxic diatoms *Pseudo-nitzschia fraudulenta* and *P. calliantha* from Russian waters of East/Japan Sea and Sea Okhotsk // Ocean Science Journ. — 2008. — Vol. 43. — P. 25–30.

Yu Z., Sengco M.R., Anderson D.M. Flocculation and removal of the brown tide organism *Aureococcus anophagefferens* (Chrysophyceae), using clays // J. Appl. Phycol. — 2004. — Vol. 16. — P. 101–110.

Поступила в редакцию 19.08.15 г.