

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ МОРЯ

На правах рукописи

АЙЗДАЙЧЕР  
Нина Александровна

УДК 582.26.035.2+581.16.11.19

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ МОРСКИХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ  
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ  
03.00.18 - гидробиология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Владивосток  
1987

Работа выполнена в Институте биологии моря Дальневосточного  
отделения Академии наук СССР

Научный руководитель - доктор биологических наук

Э.А. Титлянов

Официальные оппоненты - доктор биологических наук

З.М. Азбукина

кандидат биологических наук

И.С. Гусарова

Ведущее учреждение - Институт биологии южных морей

АН УССР (г. Севастополь)

Защита состоится "4" *мая* 1988 г. в 10 часов на

совета по присуждению ученой  
степени кандидата биологических наук  
66.01 при Институте биологии  
и зоологии АН СССР, по адресу: 690022,  
Владивостоку, 159, Институт

находится в центральной библиотеке

*марта* 1988 г.

г.б.н.

*Гнездилова*  
С.М. Гнездилова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

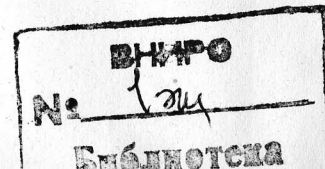
Актуальность темы. Рациональное использование природных ре-  
сурсов и интенсификация воспроизводства объектов марикультуры во  
многом определяются трофическими особенностями прибрежных вод.  
Без знания трофодинамических процессов отсутствуют реальные пред-  
посылки увеличения биологической продуктивности используемых ак-  
ваторий. Получение количественных показателей питания животных с.  
ановится возможным при использовании в качестве корма культур  
одноклеточных водорослей (Гаевская, 1959; Петипа, Тен, 1971). Кол-  
лекционные культуры водорослей играют важную роль в эксперимен-  
тальных работах и использование их в опытах имеет почти неограни-  
ченные возможности. Культуры водорослей незаменимы и при изучении  
экологии и вопросов метаморфоза водных беспозвоночных (Хребтова,  
1984). Они являются удобными модельными объектами для разработки  
и проверки математического описания закономерностей роста, при  
изучении минерального питания водорослей (Leibo, Jones, 1963;  
Тренкеншу, 1984), фотоэнергетических процессов в клетках водорос-  
лей (Белянин и др., 1980).

Непрерывным условием проводимых работ, связанных с культурами  
водорослей, является непрерывное ведение самих культур водорос-  
лей. Традиционным способом поддержания культур водорослей счи-  
тается периодический пересев их на свежую питательную среду (Лан-  
ская, 1971; Сиренко, 1975). При этом отмечается измельчение клеток  
в культуре, изменение морфологических и функциональных свойств  
организмов (Имшенецкий, 1952; Скабичевский, 1959; Финкл, Ульрих,  
1983). Кроме того для поддержания культур при пересевах затрачи-  
вается много труда и средств, особенно, когда коллекция многочис-  
ленна. В связи с этим при культивировании коллекционных культур  
водорослей весьма актуальной представляется проблема консервации  
и длительного хранения засеваемого материала в жизнеспособном со-  
стоянии.

Цель и задачи работы. Целью работы было изучение жизнеспособ-  
ности трех видов одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricor-  
nutum* Bohlin., *Porphyridium stuentum* Naeg. и *Platymonas viri-  
dis* Rouch. в зависимости от условий хранения.

В связи с этим задачи исследования определились следующим  
образом:

- исследовать влияние температуры и режимов освещения на сохра-  
нение жизнеспособности трех видов водорослей.





- изучить влияние возраста культур водорослей на сохранение их жизнеспособности.
- определить характер взаимодействия водорослей в смешанных культурах в процессе и после хранения.

Научная новизна. Впервые на трех видах морских одноклеточных водорослей, относящихся к разным систематическим группам, в сравнительном аспекте исследована жизнеспособность их после хранения. Установлены сроки хранения в разных температурных и световых условиях, а также отмечены особенности, характерные для каждого вида. Выявлена обратная зависимость между жизнеспособностью и температурой для двух видов водорослей *Phaeodactylum tricoratum* и *Platomonas viridis*, а для *Porphyridium cruentum* - отсутствие влияния температуры на выживаемость.

Установлена роль света как при хранении культур водорослей, так и влияние его на способность к восстановлению после хранения. Обнаружена чрезвычайно высокая жизнеспособность *Porphyridium cruentum* после хранения в темноте. Выявлено влияние возраста культур водорослей на их жизнеспособность в процессе хранения.

Впервые проведено исследование жизнеспособности водорослей в смешанных культурах после хранения. Установлены разные сроки выживаемости водорослей в моно- и смешанных культурах. Основываясь на разной темновой выживаемости водорослей разработан новый способ выделения монокультур водорослей, на который получено авторское свидетельство № 1084296.

Практическая ценность. Проведенные работы по исследованию жизнеспособности водорослей после хранения дали возможность установить сроки их длительного хранения, что значительно упростило содержание лабораторных коллекций культур водорослей. Применение добавок глицерина в состав среды, на которой культивировали водоросли перед хранением, позволило увеличить срок хранения двух видов водорослей при отрицательной температуре и существенно сократить затраты глицерина. Разработанный способ выделения монокультур водорослей дал возможность получать монокультуру медленно растущих видов водорослей. Результаты исследований могут быть использованы в практике производства корма для личинок беспозвоночных и рыб и технологического сырья для получения биологически активных веществ из водорослей, а также в лабораторном культивировании коллекций культур водорослей при решении ряда теоретических и практических вопросов гидробиологии и альгологии.

- Основные положения, выносимые на защиту: 1) жизнеспособность микроводорослей в процессе хранения зависит от температуры; 2) добавка глицерина обеспечивает положительный эффект при хранении микроводорослей только при отрицательной температуре; 3) темповая выживаемость микроводорослей в моно- и смешанных культурах неодинакова и зависит от вида.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались: на II Всесоюзной конференции по морской биологии (Владивосток, 1982); на VII региональном совещании по биологическим ресурсам шельфа и их рациональному использованию (Петропавловск-Камчатский, 1982); на IV Всесоюзном совещании по научно-техническим проблемам марикультуры (Владивосток, 1983); на Всесоюзной конференции "Создание естественной кормовой базы для повышения продуктивности рыбодоводства" (Рыбное, 1984); на отчетных сессиях Отдела марикультуры ТИНРО; на филологической секции Приморского отделения Всесоюзного ботанического общества (1981); на объединенном заседании Приморского отделения Всесоюзного ботанического общества и Всесоюзного биохимического общества (1983); на научных семинарах Отдела экологической физиологии морских планктонных водорослей ИнБЮМ АН УССР (Севастополь, 1984) и Лаборатории физиологической экологии ИБМ ДВО АН СССР (Владивосток, 1986); на конференции, посвященной 20-летию создания Отдела биологии моря (Владивосток, 1987); на Экологическом семинаре Института биологии моря (1987).

Публикации. Основной материал диссертации опубликован в II работах, из которых 5 в соавторстве.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и приложения. Работа изложена на 147 страницах машинописного текста, иллюстрирована 25 рисунками и 6 таблицами. Список цитируемой литературы включает 234 наименования, из них 104 - иностранных.

#### СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обосновывается необходимость проведения работ по исследованию жизнеспособности водорослей после хранения.

Первая глава посвящена обзору литературы по способам хранения одноклеточных водорослей.

Существующие способы хранения основаны на изменении физических и химических параметров, не подавляющих способности организмов к восстановлению. Культуры водорослей хранят как при положительных



температурах, так и температурах ниже 0°C. При температурах выше 0°C коллекционные культуры хранят как на жидкой, так и агаризованной питательных средах (Schwarze, 1975; Андреева, Стрелкова, 1983; Громов, Титова, 1983). Применяемый температурный режим для хранения культур водорослей может быть различным. По данным ряда авторов используют температуры 22-24°C (Громов, 1965; Владимирова, Маркелова, 1983) и 2-8°C (Одоевская и др., 1969; Елизаова, 1978).

При анализе литературных данных по хранению водорослей в условиях положительных температур нельзя не остановиться на освещении, так как хранение может осуществляться как на свету, так и в темноте (Smyda, Mitchell-Innes, 1974; Одоевская, 1976). Было высказано предположение (Umebayashi, 1972), что либая освещенность полученная популяцией, вызывает положительный эффект при хранении водорослей. Однако не все водоросли одинаково реагируют на освещение. Так, *Scalotopema costatum* быстро утрачивала жизнеспособность, несмотря на периодическое освещение (Antia, 1977). Вероятно, различия в выживаемости водорослей обусловлены особенностями отдельных видов (Влизарова, 1982).

Рассматривается также возможность хранения водорослей при отрицательной температуре. Исследования по действию отрицательной температуры на биологические объекты получили развитие после открытия криозащитных свойств глицерина (Polge et al., 1949). Успех, полученный в результате применения добавок глицерина при консервации клеток и тканей в животноводстве и медицине (Смит, 1963; Виноград-Финкель, 1967; Никитин, Звягин, 1971), побудил исследователей к изучению жизнеспособности водорослей после хранения при отрицательных температурах (Одоевская, 1976; Morris, 1976, 1977; Novak, Bednarz, 1976; Терешкова, Белянин, 1977; Saks, 1978). Проведенные исследования показали, что возможность применения отрицательной температуры для хранения фотосинтезирующих организмов ограничена. Процент жизнеспособных клеток был очень низким. Наиболее перспективным в настоящее время можно считать хранение при температуре жидкого азота (-196°C), используя метод двухступенчатого замораживания (Morris, 1978). Недостатком этого метода является то, что он требует постоянного жесткого контроля за температурой в течение всего периода хранения.

Использование лиофилизации для хранения микроводорослей показало чрезвычайно низкий процент жизнеспособных клеток, который колебался от 0,01 до 3% (Holm-Hansen, 1964, 1968; Tsuru, 1973;

Одоевская, 1976; Grath et al., 1977).

Обзор литературы, касающийся методов хранения водорослей показывает, что они находятся в стадии экспериментальных разработок. На данном этапе предпринимаются попытки найти доступные способы длительного хранения водорослей в жизнеспособном состоянии.

Во второй главе дана краткая характеристика объектов исследования, описаны условия поддержания рабочей коллекции водорослей, приведены методики проведения экспериментов.

Рабочая коллекция культур водорослей Лаборатории физиологической экологии ИБМ включает девять культур морских водорослей, относящихся к разным систематическим группам. Большая часть культур была любезно предоставлена Л.А. Ланской из коллекции Института биологии южных морей АН УССР (г. Севастополь).

Культуры водорослей культивировали на жидкой минеральной среде путем периодических пересевов. Для выращивания культур водорослей использовали питательную среду Гольдберга в модификации Кабановой (1961). Основой для приготовления питательной среды служила стерилизованная морская вода из залива Петра Великого соленостью 32-33‰. Стерилизацию воды осуществляли способом, описанным Ланской (1971).

В качестве объектов исследования были выбраны три вида морских одноклеточных водорослей: диатомовая *Phaeodactylum tricorneratum* Bohlin., зеленая *Platomonas viridis* Rouch. и красная *Porphyridium cruentum* Naeg. Выбор объектов исследования обусловлен постоянным интересом к водорослям в связи с использованием в качестве корма для культивируемых животных и перспективами получения из порфиридума полисахаридов и арахидоновой кислоты (Percival, 1977; Vonshack et al., 1985).

*Phaeodactylum tricorneratum* Bohlin. - диатомовая полиморфная водоросль, как правило, в культуре имеет два морфотипа - веретеновидный и трехлучевой, способна к внезапным превращениям одного морфотипа в другой. Размер клеток варьирует от 3x20 до 4x25 мкм. При неблагоприятных условиях водоросль не образует покоящихся стадий (Smyda, Mitchell-Innes, 1974). Размножается путем вегетативного деления клеток пополам. Хороший рост в массовой культуре делает ее ценным объектом, используемым в гидробиологических экспериментах (Walne, 1956; Ansell et al., 1963; Хребтова, 1984).

*Porphyridium cruentum* Naeg. - одноклеточная красная водоросль, является примитивным представителем Rhodophyta. Клетки



порфиридиума имеют сферическую форму, 4-12 мкм в диаметре. Размножается порфиридиум вегетативно. Покоящихся стадий (спор, цист) при неблагоприятных условиях не образует (Leibo, Jones, 1963; Gantt, 1975). Отличается высоким содержанием в клетках полиненасыщенных жирных кислот, таких как арахидоновая и эйкозапентаеновая (Askman et al., 1968). Кроме того может выделять в среду желеобразующие полисахариды (Percival, 1977; Темных и др., 1984).

Зеленая водоросль *Platymonas viridis* Rouch. - является представителем сем. Chlamydomonadaceae. Средний размер 10-13x5-10 мкм, резко варьирует от условий выращивания. При неблагоприятных условиях образует многочисленные цисты. Цисты в культуре появляются через 2-3 недели (Роухийянен, 1966). Размножается вегетативно. Водоросль может использоваться непосредственно в качестве корма для культивируемых беспозвоночных животных и как промежуточное звено в питании рыб (Аронович, 1969; Аронович, Спекторова, 1971).

В настоящей работе рост культур водорослей выражали через увеличение численности клеток. В качестве критерия жизнеспособности использовалась удельная скорость роста водорослей, которую рассчитывали по формуле, учитывая лаг-фазу:

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

где  $N_1$  и  $N_2$  - численность клеток в начале и конце опыта;  $t_1$  и  $t_2$  начальное и конечное время опыта.

При обработке данных лабораторных экспериментов применялись стандартные методы математической статистики.

Эксперименты по изучению влияния различной температуры (-5, 8 и 22±2°C) на жизнеспособность водорослей проводили в четырех модификациях: образцы хранили с добавкой 10% глицерина (1) и с добавкой 1% диметилсульфоксида (ДМСО) (2) непосредственно перед хранением, водоросли перед хранением культивировали на среде с добавкой 0,15% глицерина и после этого образцы подвергали хранению (3) и образцы хранили в обычной среде (4).

С целью изучения влияния освещения исследуемые образцы хранили в темноте, при 12-часовом и кратковременном освещении как с добавками глицерина и диметилсульфоксида, так и без добавок. Все эксперименты были поставлены в трех повторностях.

Эксперименты проводили по схеме: в несколько пробирок перенесли суспензию клеток водорослей (по 3 мл в каждую) и закрывали колпачками. Эксперимент продолжался 4-6 месяцев. Для определения

жизнеспособности водорослей через каждые 30 суток культуры из пробирок пересевали на свежую питательную среду с последующим подращиванием в течение четырех-семи суток и ежедневным подсчетом числа клеток в камере Горяева.

Эксперименты по влиянию возраста культуры на жизнеспособность водорослей в процессе хранения проводили на культурах, взятых на экспоненциальной и стационарной стадиях периодического культивирования.

Эксперименты по изучению жизнеспособности водорослей в смешанных культурах после хранения проводили на смешанных культурах *Platymonas viridis* - *Phaeodactylum tricornerutum*, *Platymonas viridis* - *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornerutum* - *Porphyridium cruentum*. Для определения степени взаимовлияния водорослей в смешанных культурах использовали показатели скорости роста водорослей, полученные для монокультур водорослей.

В третьей главе представлены результаты экспериментального изучения роста моно- и смешанных культур после хранения.

В разделе 3.1 приведены результаты по подбору концентраций глицерина и диметилсульфоксида (ДМСО), не влияющих на скорость роста водорослей. Такими концентрациями для исследуемых видов водорослей оказались 10% концентрация глицерина и 1% концентрация диметилсульфоксида. Эти концентрации химических соединений использовались в дальнейшей экспериментальной работе в качестве добавок, играющих роль крипротекторов при отрицательной температуре и возможных источников дополнительного питания при положительной температуре.

В разделе 3.2 рассмотрена жизнеспособность водорослей после хранения в разных температурных условиях.

После хранения водорослей при температуре -5°C в течение 30 суток клетки феодактилума полностью утрачивали жизнеспособность, а у платимонасы и порфиридиума часть клеток оставалась жизнеспособной, но скорость роста уменьшалась. Увеличение срока хранения до 60 суток приводило к полной потере жизнеспособности (рис. 1).

Аналогичный результат был получен при хранении водорослей при этой же температуре с добавкой 1% ДМСО. Известно, что ДМСО в качестве крипротектора применяют в более высоких концентрациях от 2,5 до 5% (Tsuru, 1973; Morris, 1976). В нашем же случае подобные концентрации приводили к лизису клеток, а 1% добавка его не оказывала криозащитного действия.

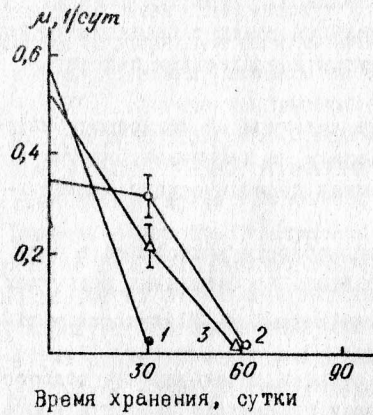


Рис. 1. Удельная скорость роста водорослей после хранения при температуре  $-5^{\circ}\text{C}$  (без добавок).

- 1 - феодактидум;  
2 - платимонас;  
3 - порфиридиум.

Иную картину наблюдали при использовании в качестве криопротектора добавок глицерина. 10% добавка его приводила к увеличению жизнеспособности водорослей на 30 суток, по сравнению с хранением без добавок. Лучший результат был получен в опытах, когда водоросли перед хранением подрачивали на среде с добавкой 0,15% глицерина (рис. 2).

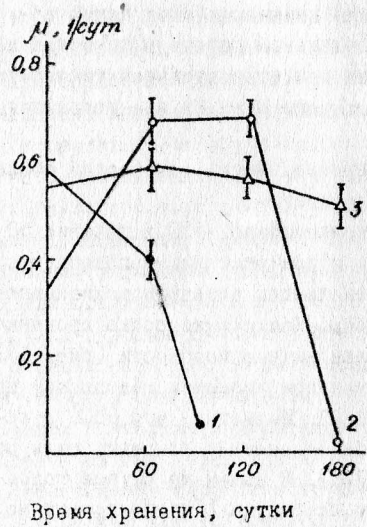


Рис. 2. Удельная скорость роста водорослей после хранения при температуре  $-5^{\circ}\text{C}$  (перед хранением водоросли подрачивали на среде с добавкой глицерина).

- 1 - феодактидум;  
2 - платимонас;  
3 - порфиридиум.

Таким образом, при изменении условий культивирования изменялся и отклик водорослей на действие отрицательной температуры. Срок сохранения жизнеспособных клеток феодактидума увеличивался до 90 суток, по сравнению с хранением без добавок (рис. 1 и 2 кривая 1). Клетки платимонаса оставались жизнеспособными до 150 суток, жизнеспособность порфиридиума в этом случае не уменьшалась и после 180 суток хранения, в то время как при хранении без добавок клетки утрачивали жизнеспособность после 60 суток хранения.

В целом проведенные эксперименты по хранению водорослей при температуре  $-5^{\circ}\text{C}$  показали, что жизнеспособность водорослей после хранения определялась как видовой принадлежностью водорослей, так и условиями культивирования водорослей перед хранением.

В опытах по хранению водорослей при  $8^{\circ}\text{C}$  установлено, что культура феодактидума сохраняла жизнеспособность в течение 180 суток (рис. 3). Незначительные колебания удельной скорости роста отме-

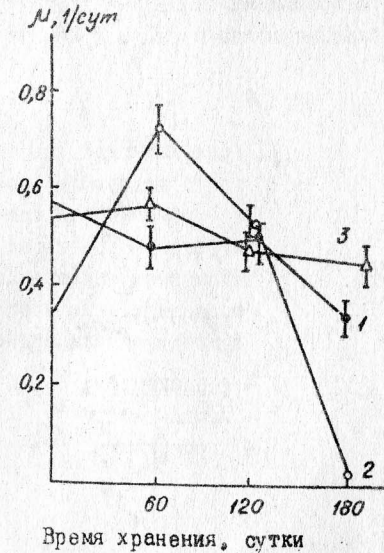


Рис. 3. Удельная скорость роста водорослей после хранения при температуре  $8^{\circ}\text{C}$  (без добавок).

- 1 - феодактидум;  
2 - платимонас;  
3 - порфиридиум.

чены в течение 120 суток хранения. В этот период времени мало заметны и морфологические изменения клеток. Увеличение времени хранения до 180 суток приводило к уменьшению размера клеток, они становились с едва различимым хлоропластом, сконцентрированным в центре клетки.



Добавки 10% глицерина и 1% ДМСО приводили к быстрой потере жизнеспособности феодактилума. Особенно быстро гибель клеток наступала в опытах с добавкой 10% глицерина. Клетки значительно медленнее уменьшались в размерах, но быстро обесцвечивались и разрушались. Возможно, эти соединения в темноте не могут использоваться водорослями для поддержания жизнеспособности, и длительное воздействие их вызывает необратимые изменения в клетках. Так, при длительном воздействии глицерина на хлореллу при положительной температуре возникали изменения в ультраструктуре клеток (Plattner et al., 1972) и наблюдалась потеря избирательной способности мембран (Syrett, 1973).

Добавка глицерина в минеральную среду при культивировании водорослей перед хранением увеличивала жизнеспособность водорослей. Особенно ярко положительный эффект выражен у платимонаса. Если в опытах без добавок культура платимонаса не восстанавливалась после 180 суток хранения, то с добавками глицерина клетки оставались жизнеспособными в течение всего периода хранения (рис. 3 и 4 кривая 2).

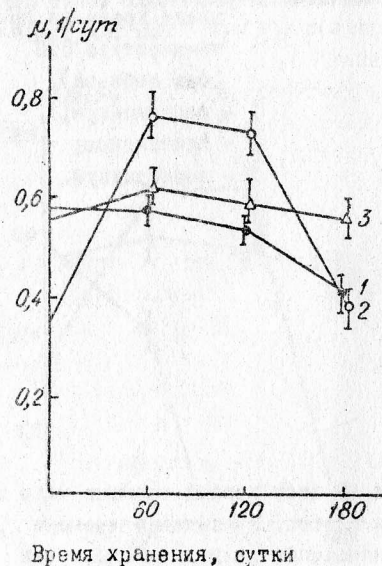


Рис. 4. Удельная скорость роста водорослей после хранения при температуре 8°C (перед хранением водоросли подращивали на среде с добавкой глицерина).

1 - феодактилум;  
2 - платимонас;  
3 - порфиридиум.

Повышение температуры, при которой хранились водоросли, до 22°C вызывало более быструю потерю жизнеспособности феодактилума

и платимонаса. Клетки порфиридиума оставались жизнеспособными после продолжительного хранения (180 суток). Обнаруженную чрезвычайно высокую жизнеспособность порфиридиума, по-видимому, можно объяснить способностью этой водоросли переходить в состояние "спячки" (Bisalputra, Antia, 1980). Возможно, такой устойчивости способствуют и вещества полисахаридной природы, выделяемые клеткой и образующие подобие капсулы вокруг клетки, как бы консервируя ее длительное время без структурных изменений (Ramus, 1972; Kieras et al., 1976).

В результате проведенных экспериментов можно заключить, что порфиридиум длительное время (180 суток) остается жизнеспособным без изменения скорости роста как при 8°C, так и при 22°C. Для феодактилума и платимонаса важное значение имеет температура хранения: при 8°C культуры остаются жизнеспособными в течение длительного времени (150 суток платимонас и 180 суток феодактилум). Повышение температуры хранения до 22°C вызывало быструю потерю жизнеспособности (феодактилума через 60 суток, платимонаса через 120 суток). Добавка глицерина в среду при культивировании перед хранением приводила к повышению жизнеспособности водорослей.

В разделе 2.2 рассмотрена жизнеспособность водорослей после хранения в разных условиях освещения.

Кратковременное освещение при температуре 8°C увеличивало жизнеспособность феодактилума и платимонаса по сравнению с хранением в темноте (рис. 5). В этих условиях клетки в течение более

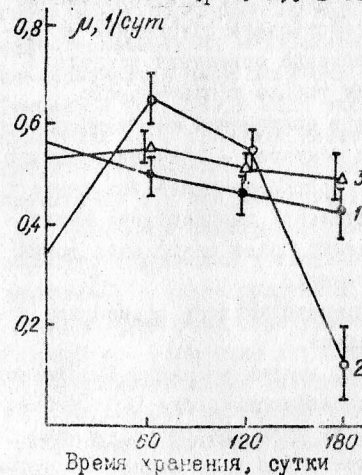


Рис. 5. Удельная скорость роста водорослей после хранения при температуре 8°C и кратковременном освещении (без добавок).

1 - феодактилум;  
2 - платимонас;  
3 - порфиридиум.

длительного времени оставались без глубоких морфологических изменений: не уменьшались в размере, не наблюдалось сжатие хлоропластов, сохранялась правильная форма клеток. Подобные результаты были получены Умебаяси (Umebayashi, 1972). Однако, как показали эксперименты других авторов, кратковременное освещение не всегда дает положительные результаты. В наших опытах можно видеть, что разные виды водорослей неодинаково реагируют на освещение. Порфиридиум хорошо сохранял жизнеспособность как в темноте, так и при кратковременном освещении, жизнеспособность платимонаса если и увеличивалась, то в меньшей степени, чем у феодактилума (рис. 3 и 5).

В опытах с добавкой 1% ДМСО и кратковременном освещении жизнеспособность водорослей не увеличивалась. Иную картину наблюдали в опытах с кратковременным освещением и добавкой 10% глицерина. Добавка глицерина в этом случае вызывала снижение жизнеспособности, которое выражалось в уменьшении скорости роста, наблюдаемое у феодактилума после 60 суток хранения, у платимонаса — после 120 суток хранения. Клетки обесцвечивались и культуры приобретали серый, неживой оттенок.

Таким образом, добавки ДМСО и глицерина в сочетании с кратковременным освещением при температуре 8°C не дали положительных результатов в сохранении жизнеспособности водорослей.

Исследовали также влияние кратковременного освещения на жизнеспособность при более высокой (22°C) температуре. Кратковременное освещение при этой температуре не способствовало сохранению жизнеспособности водорослей, а увеличение периода освещения привело к значительному увеличению срока хранения только у платимонаса.

Таким образом, наилучший результат в сохранении жизнеспособности водорослей получен при комбинации двух факторов — кратковременного освещения и температуры 8°C. Вероятно, кратковременное освещение только в сочетании с пониженной положительной температурой может уменьшить траты запасных веществ, и клетки более длительное время могут оставаться в жизнеспособном состоянии.

В разделе 2.4 рассмотрена роль возраста культур водорослей в сохранении жизнеспособности после хранения.

Показано, что культура феодактилума, взятая на экспоненциальной стадии роста, сохраняла высокую жизнеспособность после 180 суточного хранения. В то же время скорость роста этой водоросли, взятой на стационарной стадии роста, была значительно ниже после 120 суток

хранения (табл. 1). Большую роль в сохранении жизнеспособности феодактилума, как показали наши опыты, играют метаболиты водорослей, выделяемые клетками во время активного роста. Стрицательное влияние на жизнеспособность этой водоросли оказывают метаболиты, полученные из культуры на стационарной стадии роста. Возможно, выделяемые клетками вещества подавляют способность к делению. Ингибирование роста было обнаружено на культурах диатомовых водорослей Спенсером (Spencer, 1954) и Кустенко (1974) и на культуре хлореллы (Таутс, 1974). Однако эффект самоингибирования наблюдается не всегда. В наших опытах для культуры платимонаса не отмечено влияние возраста на жизнеспособность клеток (табл. 2).

Таким образом при хранении культур водорослей необходимо учитывать их возраст.

Раздел 2.5 посвящен изучению жизнеспособности водорослей в моно- и смешанных культурах.

При изучении роста смешанных культур нами был показан эффект ингибирования роста феодактилума и порфиридиума видом-партнером платимонасом. Однако характер ингибирования был неодинаков: не более сильное, но кратковременное ингибирование феодактилума отмечали во время активного роста платимонаса, в то же время ингибирование порфиридиума было продолжительным и возрастало с увеличением времени экспозиции. Можно полагать, что ингибирование феодактилума происходило метаболитами, выделяемыми платимонасом на ранних стадиях его развития. В противоположность этому в ингибировании порфиридиума ведущая роль принадлежит, по-видимому, эффекту накопления метаболитов в культуральной среде. Подобные закономерности были получены для цианобактерий (Таутс, 1964; Тамбиев и др., 1983). Наши эксперименты показали, что в смешанных культурах срок хранения некоторых водорослей в жизнеспособном состоянии сокращается. Наиболее резкое снижение жизнеспособности характерно для феодактилума (рис. 6).

Анализируя полученные данные, можно отметить, что жизнеспособность водорослей в смешанных культурах зависит не только от выделяемых в среду продуктов обмена, но также и от температуры хранения. При этом обнаружена следующая закономерность: чем выше температура, тем ниже жизнеспособность водорослей.

Используя разную выживаемость водорослей в смешанных культурах был разработан способ выделения монокультур водорослей, которые трудно получить общепринятыми методами. Используемый преж-



Таблица I

Удельная скорость роста ( $M$ ) культуры *Rhizoctonia tricosporium* разного возраста после хранения резной продолжительности (температура 8°C)

Номер опытов	Условия опытов	До хранения (контроль)	60 сут.	120 сут.	180 сут.
1	Инокулят - суспензия клеток на экспоненциальной стадии роста	0,58±0,03	0,68±0,04	0,45±0,04	0,46±0,05
2	Инокулят - суспензия клеток на стационарной стадии роста	0,57±0,03	0,68±0,03	0,10±0,07	0,02
3	Инокулят - клетки на стационарной, метаболиты на экспоненциальной стадии роста	0,57±0,07	0,68±0,03	0,19±0,09	0,01
4	Инокулят - клетки на экспоненциальной, метаболиты на стационарной стадии роста	0,52±0,03	0,56±0,04	0,01	0

14

Таблица 2

Удельная скорость роста ( $M$ ) культуры *Platymonas viridis* разного возраста после хранения резной продолжительности (температура 8°C)

Номер опытов	Условия опытов	До хранения (контроль)	60 сут.	120 сут.	180 сут.
1	Инокулят - суспензия клеток на экспоненциальной стадии роста	0,55±0,08	0,41±0,09	0,61±0,12	0,42±0,14
2	Инокулят - суспензия клеток на стационарной стадии роста	0,50±0,05	0,45±0,04	0,56±0,08	0,39±0,08
3	Инокулят - клетки на стационарной, метаболиты на экспоненциальной стадиях роста	0,52±0,07	0,47±0,04	0,51±0,11	0,35±0,11
4	Инокулят - клетки на экспоненциальной, метаболиты на стационарной стадиях роста	0,54±0,09	0,52±0,08	0,59±0,10	0,45±0,11

15

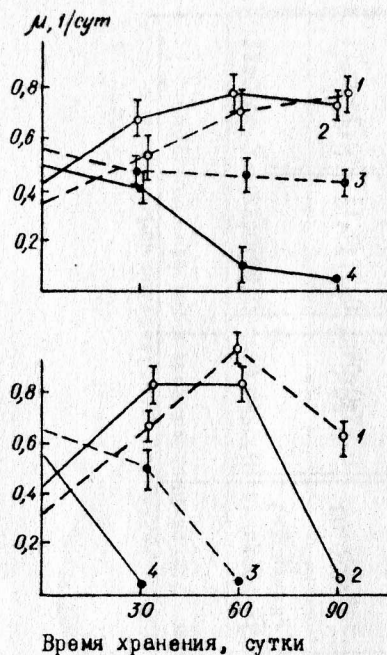


Рис. 6. Удельная скорость роста водорослей после хранения в моно- и смешанной культурах.

1 - платимонас в монокультуре;  
2 - платимонас в смешанной культуре;  
3 - феодактилум в монокультуре;  
4 - феодактилум в смешанной культуре.

де метод автоматического отбора микроводорослей при турбидостатном культивировании давал возможность получить культуру только более активно растущего вида (Цоглин и др., 1967). Применение микробиологических методов для выделения монокультур водорослей (Сиренко, 1975) также не всегда приводило к желаемому результату. Метод темновой выживаемости, предложенный нами, позволяет получить культуру и менее активно растущего вида; при этом упрощается процесс выделения водорослей в монокультуру.

Таким образом, при выборе условий хранения водорослей важно учитывать биологические особенности организмов, варьирующие от вида к виду. Красная водоросль *Porphyridium cruentum*, обладающая наиболее примитивной клеточной организацией, оказалась самой устойчивой к действию длительного затемнения. Для длительного хранения (до 180 суток) этой водоросли можно рекомендовать содержание при температуре 8 и 22°C. Продолжительное время (также до 180 суток) можно хранить ее и при температуре -5°C, но при

этом водоросли перед хранением необходимо культивировать на среде с добавкой глицерина. Для зеленой водоросли *Platymonas viridis* оптимальными можно считать условия хранения при температуре 8°C в сочетании с кратковременным освещением, либо при тех же температурных условиях, но перед хранением водоросли подрачивать в среде с добавкой глицерина. Оптимальными условиями для хранения диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* являются пониженная положительная температура (8°C) в сочетании с кратковременным освещением. Следует также учитывать, что на жизнеспособность ряда водорослей существенное влияние оказывает возраст культуры, условия реактивации, в частности, освещенность.

#### ВЫВОДЫ

1. Наиболее благоприятными температурными условиями для *Phaeodactylum tricornutum* и *Platymonas viridis* являются пониженные положительные температуры (8°C). Высокая (22°C) и отрицательная (-5°C) температуры вызывают быструю потерю жизнеспособности этих водорослей. Красная водоросль *Porphyridium cruentum* менее чувствительная к изменению температуры. Она хорошо хранится при температурах 8 и 22°C и только достаточно продолжительное воздействие температуры -5°C (60 суток) оказывает отрицательное действие.

2. Исследование действия добавок химических соединений (глицерин и диметилсульфоксид) при хранении водорослей показало, что 10% глицерин дает положительный эффект только при отрицательной температуре. Добавка этого вещества при положительных температурах ухудшает условия хранения. При этом наблюдается следующая закономерность: чем выше температура хранения, тем сильнее выражен отрицательный эффект добавки глицерина. Наилучший эффект был достигнут, если глицерин добавляли в среду при культивировании водорослей перед хранением. В этом случае водоросли оставались жизнеспособными после пяти-шести месяцев хранения. Добавка диметилсульфоксида ни в одном опыте не дала выраженного положительного эффекта.

3. Действие света при хранении водорослей неоднозначно для разных видов. Кратковременное освещение увеличивает срок хранения *Phaeodactylum tricornutum* и *Platymonas viridis*. *Porphyridium cruentum* в период хранения к свету индифферентен.



4. Решающую роль в сохранении жизнеспособности *Phaeodactylum tricoratum* играет возраст культуры. Для жизнеспособности *Platymonas viridis* этот фактор не имеет столь решающего значения, однако, отмечена разная способность к восстановлению молодых и старых клеток.

5. Взаимодействие между видами наблюдается как в процессе хранения, так и во время культивирования водорослей до и после хранения. Наибольшей ингибирующей способностью обладает *Platymonas viridis*; ингибирующее действие *Pl. viridis* особенно ярко выражено во время активного роста культуры при смешанном культивировании.

6. Темновая выживаемость микроводорослей в моно- и смешанных культурах неодинакова. На основе разной темновой выживаемости микроводорослей в смешанных культурах был предложен новый способ получения монокультур микроводорослей. Использование этого способа позволяет получить монокультуры микроводорослей, которые трудно выделить традиционными методами.

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. Хранение культур морских микроводорослей // Гидробиол. ж. -1981. - № 4. - С. 51-55 (соавт. В.М. Воропаев).
2. Способы длительного сохранения микроводорослей в жизнеспособном состоянии // Биологические основы рационального использования, преобразования и охраны растительного мира: Тез. докл., Петропавловск-Камчатский, июль-авг. 1982 г. - Петропавловск-Камчатский: ДВНЦ, 1982. - С. 5.
3. Влияние возраста и фильтратов на жизнеспособность культуры *Phaeodactylum tricoratum* // Биология шельфовых зон Мирового океана: Тез. докл., Владивосток, сент., 1982 г. - Владивосток: ДВНЦ, 1982. - Ч. 3. - С. 53.
4. Жизнеспособность культур морских одноклеточных водорослей в различных условиях // Биология шельфовых зон Мирового океана: Тез. докл., Владивосток, сент. 1982 г. - Владивосток: ДВНЦ, 1982. - Ч. 3. - С. 95. (соавт. В.А. Силкин).
5. Биотехнология хранения культур морских одноклеточных водорослей // Научно-технические проблемы марикультуры: Тез. докл., Владивосток, сент.-окт., 1983 г. - Владивосток: ТИПРО, 1983. - С. 117-118.

6. Влияние режимов освещения на выживаемость водоросли *Phaeodactylum tricoratum* при длительном хранении // Марикультура на Дальнем Востоке. - Владивосток: ТИПРО, 1983. - С. 120-125.

7. Жизнеспособность одноклеточной водоросли *Phaeodactylum tricoratum* после хранения в темноте // Биология моря. - 1983. № 1. - С. 36-42 (соавт. В.А. Силкин).

8. Хранение морской одноклеточной водоросли *Platymonas viridis* Rouch. при низких температурах // Гидробиол. ж. - 1983. - № 3. - С. 66-70 (соавт. В.М. Гочаков, В.А. Силкин).

9. А.с. 1084296 СССР, МКИ<sup>2</sup> С 12 N 1/12, С 12 R 1/89 №3431218/30-15. Способ получения монокультуры водорослей (В.А. Силкин, Н.А. Айзайчер // Открытия. Изобретения. - 1984. - Бюл. № 13. - С. 70-71.

10. Длительное хранение микроводорослей как кормовых объектов в аквакультуре // Создание естественной кормовой базы для повышения продуктивности рыбоводства: Тез. докл., Рыбное, сент. 1984 г. - М.: ВНИИПРХ, 1984. - С. 19-21.

11. Влияние условий хранения на скорость роста красной одноклеточной водоросли *Porphyridium cruentum* Naeg. // Марикультура на Дальнем Востоке. - Владивосток: ТИПРО, 1986. - С. 102-105.

Авг