

УДК 582. 273: 581. 1: 58. 084

В.А. СИЛКИН¹, И.Н. ЧУБЧИКОВА², И.К. ЕВСТИГНЕЕВА²¹Ин-т физиологии растений РАН,

Россия, 127276 Москва, ул. Ботаническая, 35

²Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАНУ,

Украина, 99053 Севастополь, пр. Нахимова, 2

**ПОГЛОЩЕНИЕ ЭЛЕМЕНТОВ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ
LAURENCIA PAPILLOSA (FORSK.) GREV. (*RHODOPHYTA*) В
ПРОЦЕССЕ РОСТА**

Дана оценка формирования биомассы черноморской красной макроводоросли *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. (*Rhodophyta*) и скоростей поглощения азота, а также фосфора ее талломами в процессе роста в накопительной культуре. Показано, что накопление биомассы при температуре 15,5 °С происходит интенсивнее, чем при 21,5 °С. Динамика концентрации фосфора и азота в среде носит экспоненциальный характер. Температурный фактор не влияет на процесс поглощения фосфора в области высоких концентраций, а также на удельную скорость выделения нитритов в среду. Нитратный азот в течение первого часа экспозиции поглощается интенсивнее при температуре 21,5 °С, чем при 15,5 °С.

Ключевые слова: *Laurencia papillosa*, накопительная культура, биогены, азот, фосфор, температура, скорость поглощения и выделения.

Введение

Для понимания механизмов функционирования морских прибрежных экосистем необходимо знать закономерности поглощения элементов минерального питания морскими макрофитами. Это связано прежде всего с огромной ролью, которую играют заросли макроводорослей в продуцировании органического вещества. Через макрофитное звено проходят большие потоки вещества и энергии, поэтому оценка этих потоков имеет важное значение.

Известно, что в природных условиях изменение содержания элементов минерального питания в морской воде носит сезонный характер: в холодное время года их концентрации значительно выше, чем в летний период, когда они близки к нулю, и повышение их уровня происходит эпизодически. В качестве адаптивной реакции на колебания концентрации питательных веществ многие макрофиты демонстрируют очень высокие скорости поглощения биогенов (Espinosa, Charman, 1983). Избыточное накопление минеральных элементов в тканях водорослей позволяет макрофитам интенсивно расти в течение определенного времени даже в условиях дефицита биогенов в морской воде (Силкин, Хайлов, 1988).

Эту способность накапливать элементы питания широко используют в культуре макрофитов, периодически на короткое время помещая их в питательный раствор с высокой концентрацией биогенов, где и происходит их внутриклеточное накопление. Затем водоросли переносят в среду, лишенную этих элементов, где культивируемый вид растет за счет накопленных элементов питания. Кроме того,

© В.А. Силкин, И.Н. Чубчикова, И.К. Евстигнеева, 2006

применение данного способа культивирования подавляет развитие водорослей-эпифитов, которые полностью или частично отмирают, быстро израсходовав накопленные запасы (Силкин и др., 1992).

Однако до сих пор остается не изученным вопрос об изменении кинетических параметров поглощения элементов минерального питания, и, следовательно, удельных скоростей их потоков в процессе онтогенеза у водорослей.

Рост биомассы слоевищ макрофитов в природных условиях сопровождается изменением биохимического состава (Камнев, 1999; Мессинева, 2003). Однако в природных условиях невозможно проследить, насколько это связано с изменением концентрации элементов в морской воде, а насколько определяется онтогенетической программой. Поэтому лабораторная культура макрофитов, в которой можно достаточно четко регистрировать потоки элементов, представляется наиболее удобной для решения поставленной задачи. Кроме того, известно, что температура 20 °С была ингибирующей для роста лауренции, а при температуре 15 °С отмечался оптимальный ее рост (Силкин, Евстигнеева, 2005). Поэтому данные температурные условия проведения эксперимента позволят выявить закономерности питания и роста лауренции в области температур, близких к оптимальным.

Цель настоящей работы – оценка скоростей поглощения азота и фосфора культурой *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. (*Rhodophyta*) как модельного объекта в процессе роста в накопительной культуре, что позволяет проследить их динамику в процессе онтогенеза.

Материалы и методы

Объектом нашего исследования служила морская водоросль *Laurencia papillosa*, которая обитает в прибрежной части моря на камнях и раковинах (Зинова, 1967). Водоросли собирали на глубине 0,5 м в бухте Омега Черного моря (район Севастополя). Талломы очищали от эпифитов, промывали в чистой морской воде и помещали в четырехлитровые стеклянные стаканы с морской водой, взятой в 10 милях от берега, что обеспечивало чистоту воды и низкое, близкое к нулю, содержание азота и фосфора. Водоросли содержали при освещении лампами ДРЛ (около 30 Вт·м⁻² ФАР). Перемешивание осуществляли барботажем воздухом, смену воды производили один раз в сутки. Температура воды в основном определялась погодными условиями и варьировала от 15,7 до 26,8 °С.

Фрагменты талломов лауренции, выбранные для культивирования (4 г сырой массы, что соответствует 0,39 г сухой массы), помещали в систему культивирования, позволяющую регулировать освещенность и температуру среды. Объем фотореакторов составлял 1,5 л, средой служила морская вода, в которой отсутствовали элементы минерального питания. Интенсивность света на поверхности фотореакторов была в пределах 30–40 Вт·м⁻², температура в первом фотореакторе составляла 15,5 °С, во втором – 21,5 °С.

Один раз в двое суток водоросли помещали на два часа в концентрированную питательную среду объемом 500 мл с концентрацией азота 21,6 мг/л⁻¹ и фосфора – 3,6 мг/л⁻¹. В качестве источников минерального питания

использовали NaNO_3 и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. О поглощении биогенов в ходе двухчасовой экспозиции судили по изменению их концентрации в питательной среде. Для этого определяли начальное, промежуточное (через 1 ч) и конечное (через 2 ч) содержание азота и фосфора в фотореакторах. Скорость поглощения азота и фосфора измеряли в начале эксперимента, через четыре, восемь, четырнадцать и двадцать суток, взвешивая в эти же сроки талломы лауренции для определения динамики накопления ее биомассы.

Концентрацию фосфора определяли по методу Морфи-Райли, концентрацию нитритов – с использованием реактива Грисса, и нитратов – методом их восстановления до нитритов в кадмиевой колонке (Методы ..., 1988). Статистическую обработку результатов и расчет интервалов на графиках производили с использованием доверительной вероятности 0,90.

Результаты и обсуждение

Рост биомассы лауренции в накопительной культуре. Сравнение динамики накопления биомассы лауренции в различных температурных условиях показало, что наиболее интенсивный ее рост происходит при температуре среды $15,5\text{ }^\circ\text{C}$. За двадцать суток выращивания биомасса лауренции возрастает почти в пять раз и достигает 19,8 г сырой, или 1,92 г сухой массы. При температуре $21,5\text{ }^\circ\text{C}$ прирост был менее значительным – 15,2 г сырой, или 1,47 г сухой массы. Кривые накопления биомассы хорошо аппроксимируются экспоненциальной функцией. Уравнения регрессии представлены на рис. 1.

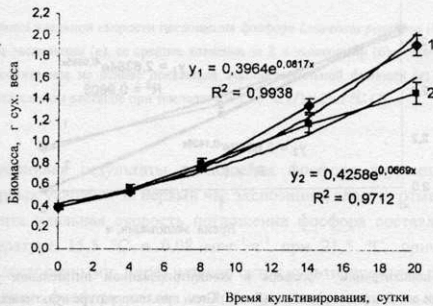


Рис. 1. Динамика накопления биомассы *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. в опытах при температуре $15,5\text{ }^\circ\text{C}$ (1), $21,5\text{ }^\circ\text{C}$ (2) и аппроксимация кривых с помощью экспоненциальной функции соответственно. Здесь и далее R^2 – величина достоверности аппроксимации.

Показатели экспонент отражают максимальные (для заданных условий) значения удельной скорости роста лауренции. Так, при температуре $15,5\text{ }^\circ\text{C}$

расчетная максимальная удельная скорость роста составляет $0,08 \text{ сут}^{-1}$, а при $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ – $0,07 \text{ сут}^{-1}$ соответственно. Эти параметры можно использовать для расчета минимального времени удвоения биомассы для фазы экспоненциального роста (Перт, 1978). При температуре $15,5 \text{ }^\circ\text{C}$ оно равно 8,5 суток, а при температуре $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ – 10,4 суток. В реальности среднее для всего ростового процесса время удвоения биомассы равно, соответственно, 8,7 и 10,5 суток.

Это свидетельствует о том, что при температуре $15,5 \text{ }^\circ\text{C}$ происходит нелIMITированный рост лауренции, а при температуре $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ее рост ограничен. Поэтому гипотеза, что при данном способе питания потоки фосфора и азота могут быть лимитирующими факторами среды, нуждается в тщательной проверке. Для этого следует выявить закономерности поглощения лауренцией элементов минерального питания и использования их в процессе роста.

Поглощение фосфора лауренцией. В качестве примера динамики концентрации фосфора при поглощении его лауренцией представлены экспериментальные данные, отражающие изменение содержания этого элемента в питательном растворе в течение двухчасовой экспозиции (рис. 2). Как следует из рисунка, процесс убывания фосфора из питательной среды, обогащенной биогенами, может быть описан экспоненциальной функцией, поэтому она принята в качестве определяющей для настоящего эксперимента. Показатели экспоненты можно использовать для оценки удельной скорости поглощения фосфора.

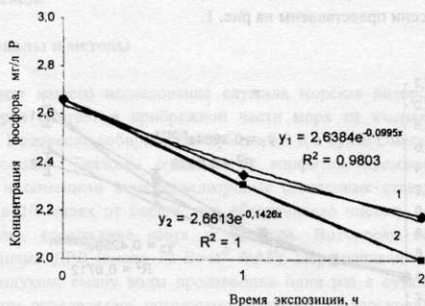


Рис. 2. Динамика концентрации фосфора в концентрированном питательном растворе при поглощении его *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. при температуре культивирования $15,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (1) и $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (2) на 4-е сутки культивирования.

Из рис. 2 следует, что снижение концентрации фосфора при температуре $21,5 \text{ }^\circ\text{C}$ происходит более интенсивно. Чтобы подтвердить это и выявить закономерности изменения удельной скорости поглощения фосфора в процессе выращивания лауренции, рассчитывали этот параметр за первый час экспозиции (рис. 3, а), его среднее значение за два часа (рис. 3, б) и значение этого параметра, рассчитанное на основе показателя экспоненциальной функции (рис. 3, в).

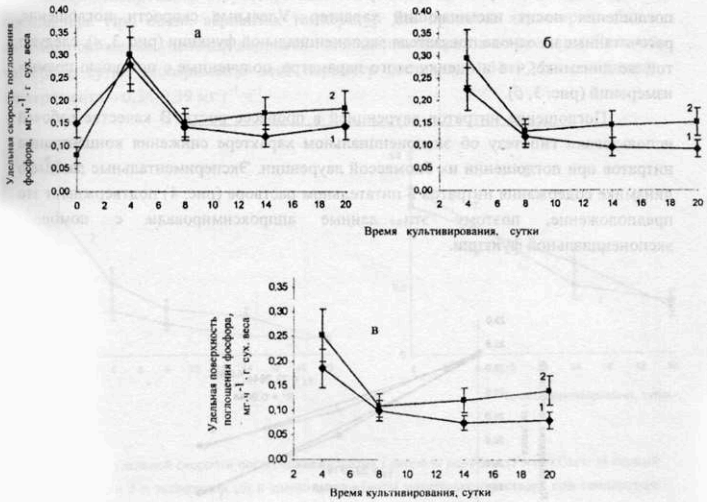


Рис. 3. Динамика удельной скорости поглощения фосфора *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. за первый час экспозиции (а), ее среднее значение за 2 ч экспозиции (б) и значение этого параметра, рассчитанное на основе показателя экспоненциальной функции (в) в концентрированном питательном растворе при температуре 15,5 °С (1) и 21,5 °С (2).

Сравнивая результаты поглощения фосфора лауренцией в различных температурных условиях за первый час экспозиции, следует отметить, что в начале эксперимента удельная скорость поглощения фосфора составляла 0,15 мг·г⁻¹·ч⁻¹ при температуре 15,5 °С и 0,08 мг·г⁻¹·ч⁻¹ при 21,5 °С, причем эти различия оказались достоверными. Через четверо суток культивирования реакция водоросли на добавление фосфора стала иной, и удельные скорости поглощения этого элемента повысились почти в два раза. Достоверных различий между опытами с разной температурой не обнаружено. Отсюда следует, что температурный фактор не влияет на процесс поглощения фосфора в области высоких концентраций. Далее, на восьмые сутки, удельная скорость поглощения фосфора снизилась до 0,14-0,15 мг·г⁻¹·ч⁻¹ и в дальнейшем оставалась примерно на этом уровне, почти независимо от температуры (рис. 3, а).

При сравнении динамики удельной скорости поглощения фосфора, рассчитанной за первый час экспозиции и средней за два часа экспозиции,

установлено, что значения этого параметра ниже по сравнению с аналогичным показателем для первого часа (рис. 3, б). Это свидетельствует о том, что за второй час экспозиции скорость поглощения существенно снижается и процесс поглощения носит насыщающий характер. Удельные скорости поглощения, рассчитанные на основе показателя экспоненциальной функции (рис. 3, в), следуют той же динамике, что и оценки этого параметра, полученные с помощью прямых измерений (рис. 3, б).

Поглощение нитратов лауренцией в процессе роста. В качестве рабочей использовали гипотезу об экспоненциальном характере снижения концентрации нитратов при поглощении их биомассой лауренции. Экспериментальные данные о динамике содержания нитратов в питательном растворе (рис. 4) подтверждают это предположение, поэтому эти данные аппроксимировали с помощью экспоненциальной функции.

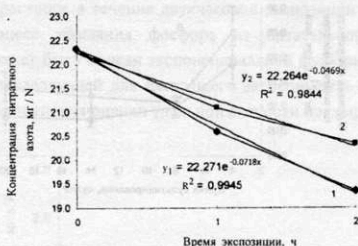


Рис. 4. Динамика концентрации нитратов в концентрированном питательном растворе при поглощении его *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. при температуре 15,5 °C (1) и 21,5 °C (2) на 20-е сутки культивирования.

Влияние температуры культивирования на скорость поглощения нитратного азота можно обнаружить, проследив динамику удельной скорости поглощения нитратов с учетом достоверности получаемых различий (рис. 5). Как показывают результаты измерения удельной скорости поглощения за первый час экспозиции, значения этого параметра при температуре 15,5 и 21,5 °C существенно различаются (рис. 5, а). Особенно значительны различия в начале эксперимента, когда при температуре 15,5 °C удельная скорость поглощения нитратов оказалась равна 1,15 мг·г⁻¹·ч⁻¹, а при 21,5 °C — 4,36 мг·г⁻¹·ч⁻¹. В процессе выращивания удельные характеристики поглощения существенно снижаются, причем при более высокой температуре наблюдаются более высокие темпы снижения. На 20-е сутки культивирования удельная скорость поглощения нитратов за первый час экспозиции выравнивается при обеих температурах, составляя 0,42-0,45 мг·г⁻¹·ч⁻¹.

При сравнении средних значений удельной скорости поглощения за два часа экспозиции наблюдается иная картина (рис. 5, б). На протяжении всего периода культивирования отсутствуют достоверные различия между параметрами поглощения. При обоих вариантах температур для процесса характерна общая динамика снижения удельной скорости поглощения нитратов во времени. Если на четвертые сутки эксперимента этот параметр составлял 1,12-1,26, то к концу эксперимента – 0,34-0,39 $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$.

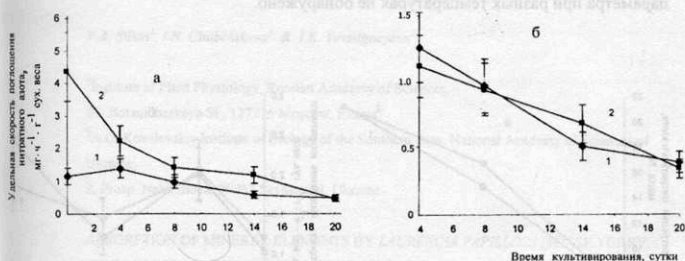


Рис. 5. Динамика удельной скорости поглощения нитратов *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. за первый час (а) и 2 ч экспозиции (б) в концентрированном питательном растворе при температуре культивирования 15,5 °С (1) и 21,5 °С (2).

При сравнении средних значений удельной скорости поглощения за два часа экспозиции наблюдается иная картина (рис. 5, б). На протяжении всего периода культивирования отсутствуют достоверные различия между параметрами поглощения. При обоих вариантах температур для процесса характерна общая динамика снижения удельной скорости поглощения нитратов во времени. Если на четвертые сутки эксперимента этот параметр составлял 1,12-1,26, то к концу эксперимента – 0,34-0,39 $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$.

Существенное различие значений удельной скорости поглощения нитратов за первый и второй час экспозиции можно объяснить, сравнив работы двух механизмов поглощения – диффузионного и активного усвоения за счет функционирования нитратредуктазы (Syrett, 1981). В первый час преобладает диффузионный механизм, а во второй, когда произошло выравнивание концентраций нитратов внутри и вне клетки, основную функцию переноса азота выполняет нитратредуктаза. Снижение удельной скорости поглощения с течением времени связано с уменьшением активности нитратредуктазы в результате лимитирования скорости синтеза этого фермента.

Выделение нитритов в процессе роста лауренции. Концентрацию нитритов в питательном растворе измеряли в начале экспозиции и через 2 ч (рис. 6, а).

Поэтому удельную скорость выделения нитритного азота рассчитывали как среднюю за 2 ч (рис. 6, б). Удельная скорость выделения нитритов у лауренции очень низка по сравнению с другими водорослями и находится в пределах 1,04-2,46 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$. С течением времени в процессе культивирования наблюдается некоторая тенденция к повышению скорости выделения, но в целом динамика этого параметра имеет колебательный характер, с максимумами на 8-й и 20-й дни культивирования. Температура среды не оказывала существенного влияния на удельную скорость выделения и достоверных различий между значениями этого параметра при разных температурах не обнаружено.

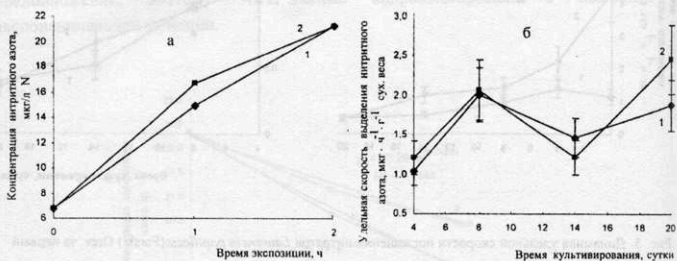


Рис. 6. Динамика концентрации нитритов, выделяемых *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. (а), и удельной скорости их выделения за 2 ч экспозиции (б) в концентрированном питательном растворе при температуре культивирования 15,5 °С (1) и 21,5 °С (2).

Некоторое повышение удельной скорости выделения нитритов с течением времени, по-видимому, связано с падением активности нитритредуктазы в процессе культивирования, причем по интенсивности оно может быть значительнее снижения активности нитратредуктазы.

Выводы

1. Процесс накопления биомассы лауренцией при температуре 15,5 °С происходит интенсивнее, чем при 21,5 °С. Кривые роста хорошо аппроксимируются экспоненциальной функцией.

2. Температурный фактор не влияет на процесс поглощения фосфора в области высоких концентраций. Динамика концентрации фосфора в питательной среде описывается экспоненциальной функцией.

3. Снижение концентрации нитратов в среде также имеет экспоненциальный характер. В течение первого часа экспозиции удельная скорость поглощения нитратного азота существенно выше при температуре 21,5 °С, чем при 15,5 °С.

4. Динамика выделения нитритов в ходе культивирования имеет колебательный характер. Температура среды не оказывает существенного влияния на удельную скорость выделения нитритного азота.

V.A. Silkin¹, I.N. Chubchikova² & I.K. Yevstigneyeva²

¹Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
35, Botanicheskaya St., 127276 Moscow, Russia

²A.O. Kovalevskiy Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Sciences of Ukraine,
2, Prosp. Nakhimova, 99053 Sevastopol, Ukraine

ABSORPTION OF MINERAL ELEMENTS BY *LAURENCIA PAPILLOSA* (FORSK.) GREV.
(RHODOPHYTA) IN THE PROCESS OF ITS GROWTH

The biomass formation of the Black Sea red macroalga *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. (*Rhodophyta*) and rates of nitrogen and phosphorus absorption by its thalli are estimated during of growth in the accumulative culture. It has been shown that accumulation of biomass at a temperature of 15.5 °C is more intensive than at 21.5 °C. Dynamics of the phosphorus and nitrogen concentration in the medium is of exponential character. The temperature factor exerts no action on the process of phosphorus absorption within the ranges of high concentrations and also on the specific rate of nitrite excretion into the medium. During the first hour of exposure, nitric nitrogen is absorbed more intensively at a temperature of 21.5 °C than at 15.5 °C.

Key words: *Laurencia papillosa*, accumulative culture, biogenes, nitrogen, phosphorus, temperature, rate of absorption and excretion.

Зинова А.Д. Определитель зеленых, бурых и красных водорослей южных морей СССР. – М.: Л.: Наука, 1967. – 397 с.

Камнев А.Н. Возрастная морфофизиология бурых водорослей (на примере представителей порядка фукусов и ламинариевых): Автореф. дис. ... докт. биол. наук – М.: Изд-во МГУ, 1999. – 74 с.

Мессинева Е.М. Возрастная морфофизиология промысловых представителей семейства *Cystoseiraceae* морей России: Автореф. дис. ... канд биол. наук. – М.: Изд-во МГУ, 2003. – 21 с.

Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 119 с.

Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 333 с.

Силкин В.А., Евстигнеева И.К. Продуктивность двух морфологических форм *Laurencia papillosa* (Forsk.) Grev. (*Rhodophyta*) в условиях культуры // Альгология. – 2005. – 15, № 2. – С. 245-253.

Силкин В.А., Золотухина Е.Ю., Бурдин К.С. Биотехнология морских макрофитов. – М.: Изд-во МГУ, 1992. – 151 с.

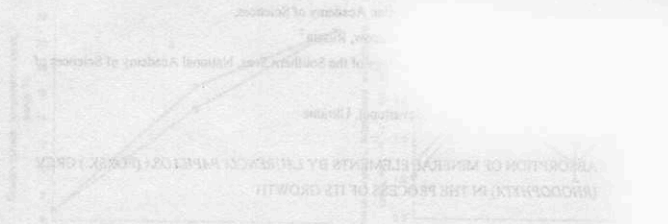
Силкин В.А., Хайлов К.М. Биологические механизмы управления в аквакультуре. – Л.: Наука, 1988. – 230 с.

Espinosa J., Chapman R.O. Ecotypic differentiation of *Laminaria longicurtis* in relation to seawater nitrate concentration // Mar. Biol. – 1983. – 74. – P. 213-218.

Syrett P.J. Nitrogen metabolism of microalgae // Bull. Fish. Aquat. Sci. – 1981. – 210. – P. 182-210.

Получена 09.09.04

Подписала в печать Л.И. Мусатенко



The present authors of the Black Sea are interested in the possibility of using the data of nitrogen and phosphate content in the seawater during the growth of *Laminaria longicurtis* in the process of its growth in the Black Sea. It has been shown that the concentration of nitrate in the seawater is directly related to the growth rate of *Laminaria longicurtis*. The concentration of nitrate in the seawater is directly related to the growth rate of *Laminaria longicurtis*. The concentration of nitrate in the seawater is directly related to the growth rate of *Laminaria longicurtis*. The concentration of nitrate in the seawater is directly related to the growth rate of *Laminaria longicurtis*.

The authors are grateful to the staff of the Institute of Biology and Fisheries of the Black Sea National University for their assistance in the work.

В.А. Силкин, И.Н. Чубчикова, И.К. Евстигнева
Институт биологии и рыбного хозяйства Черного моря
Южно-осетинский государственный университет
361025, Владикавказ, ул. Гайдара, 51

Силкин В.А., Чубчикова И.Н., Евстигнева И.К. Биологические механизмы управления в аквакультуре. – Л.: Наука, 1988. – 230 с.