

НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 582.273:574.5(262.5)

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЫ НА КОЛИЧЕСТВО АГАРА, ПИГМЕНТОВ И РОСТ ЧЕРНОМОРСКОГО *GELIDIUM SPINOSUM*© 2016 г. **Б. Н. Беляев**, канд. биол. наук, с. н. с., **Н. М. Береговая**, м. н. с.

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

E-mail: belyaevbob@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.09.2016 г. Принята к публикации 21.12.2016 г.

Результаты исследований влияния добавок Fe, Mo, Mg и Cu на ростовые характеристики и содержание пигментов и агара в талломах черноморского гелидиума *Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur. (Rodophyta) при повышении солёности черноморской воды до 26 ‰, обогащении её азотом до 4.8 и фосфором до 0.8 мг/л (среда А) показали, что добавки хелатированного хлорного железа в количестве 0.5 мг на литр (питательная среда Б) не только сохраняют жизнеспособность гелидиума в течение годового цикла, но и повышают содержание агара на 30 %, а каротиноидов и хлорофилла — более чем в 2 раза, но уровень фикоэритрина снижают на 38 %, а на этапе адаптации к культуре увеличивают среднюю удельную скорость его весового роста « μ » в 3–5 раз. Добавление в среду Б молибдена до 0.018 мг/л повышает C_{Kp} и $C_{Хл}$ на 30 %, но снижает $C_{Фэ}$ на 40 %, а до 0.3 мг/л — увеличивает « μ » на 18 %. Медь в среде Б до 0.12 мг/л уменьшает C_{Kp} в 2 раза, $C_{Хл}$ — в 1.9 раза и $C_{Фэ}$ — в 1.4 раза, а магний (до 120 мг/л) увеличивает « μ » на 19 %, $C_{Фэ}$ — на 60 %, $C_{Хл}$ — на 75 %, C_{Kp} — в 2 раза. При совместном обогащении питательной среды Б магнием (50 мг/л) и медью (0.05 мг/л) Mg способствует увеличению уровня фикоэритрина на 36.8 %, хлорофилла — на 33 %, суммарных каротиноидов — на 8.5 % и « μ » — на 5.3 %. При этом Cu непосредственно увеличивает концентрацию фикоэритрина на 9.5 % (в течение двух недель), уменьшает « μ » на 12.6 %, а во взаимодействии с Mg — ещё на 10.3 % уменьшает « μ », но на 10 % повышает уровень суммарных каротиноидов.

Ключевые слова: Чёрное море, *Gelidium spinosum*, красные водоросли, режим культивирования, ростовые характеристики, микродобавки, агар, пигменты

Красная черноморская водоросль гелидиум широколиственный *Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur. (Rodophyta) образует слоевище высотой от 2 до 10 см, сдавленное или совсем плоское, неправильно или повторно перисто разветвлённое [7]. Гелидиум ценится, прежде всего, в связи с высоким содержанием (от 25 до 50 % сухого вещества) и качеством добываемого из него агара [14], [15], как сырьевой источник фикобилипротеина R-фикоэритрина — мощного антиоксиданта и естественного красителя, суммарных каротиноидов и хлорофилла. β -каротин, составляющий большую часть суммарных каротиноидов, также обладает антиоксидантными свойствами, хлорофилл способствует очищению организма от шлаков, токсинов и бактерий, а R-фикоэритрин применяется ещё в иммунной диагностике, микроскопии и цитометрии [13]. Максимальные запасы гелидиума, обнаруженные в Чёрном море, достигают лишь 3 т [8], поэтому был сделан вывод о целесообразности проведения исследований по культивированию этой водоросли.

Содержание биогенов и микроэлементов в прибреж-

ных черноморских акваториях, как правило, на порядок выше, чем в открытой части моря [12], и обеспечивает соответствующее формирование сообществ макрофитов при наличии прочих условий. Однако культивирование в береговых системах инженерного типа предполагает некоторую интенсификацию процесса по сравнению с ростом в естественных условиях. В исследованиях с гелидиумом использованы данные, полученные в экспериментах с черноморской грацилярией, где были апробированы микродобавки железа (в диапазоне 0.05–0.35 мг на 1 л среды в виде $FeCl_3 \cdot 6H_2O$), марганца (0.005–0.055 мг/л — $MnCl_2 \cdot 4H_2O$), кобальта (0.01–0.06 мг/л — $CoCl_2 \cdot 6H_2O$), молибдена (0.01–0.03 мг/л — $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) и цинка (0.015–0.215 мг/л — $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). Из этих элементов только железо при $C_{Fe} = 0.35$ мг/л вызвало значимое (на 10–12 %) увеличение темпов роста по сравнению с $C_{Fe} = 0.05$ мг/л, а молибден лишь обозначил в первую неделю культивирования прибавку на уровне значимости ~5 % [3]. В связи с этим железо и молибден были первыми в ряду исследований с черномор-

ским гелидиумом. Кроме того, в качестве ориентира были учтены диапазоны концентраций элементов, используемые в средах при культивировании микроводорослей: железа — $0.056 \div 6.3$, молибдена — $0.0153 \div 0.995$, марганца — $0.055 \div 2.2$, кобальта — $0.011 \div 0.072$, меди — $0.020 \div 0.072$, цинка — $0.050 \div 0.074$ и магния — $19.5 \div 120$ мг/л.

Основная проблема культивирования макрофитов — это обрастания. Целью представленных исследований является поиск оптимального сочетания факторов среды, дающего максимальный выход биомассы с заданными биохимическими показателями, что невозможно без подавления эпифитов. Поэтому из перечисленного выше ряда выделили медь и магний; медь — в качестве ингибитора обрастаний. Для той же цели повышали солёность до 26 ‰ с помощью поваренной соли. Магний добавляли, чтобы выравнять соотношение ионов, присущее морской воде, т. к. при производстве соли магний удаляют.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали *Gelidium spinosum* (Grev.) Born. et Thur. (Rhodophyta), собранный в период с октября 2006 по апрель 2013 г. на глубине до 1 м с тетраподов у радиобиологического корпуса (РБК) на правом берегу бухты Карантинная либо на побережье Херсонеса между бухтами Карантинная и Песочная (Чёрное море, Севастополь). Его содержали в 250-литровом разделённом на отсеки и барботируемом сжатым воздухом аквариуме, где освещённость в дневное время не превышала 0.3 кЛк. Профильтрованную морскую воду солёностью 17–18 ‰ меняли в аквариуме раз в месяц. Эксперименты выполняли на лабораторной установке с восемью 1.5-литровыми рабочими объёмами квадратного сечения (0.1×0.1 м²) со скошенным дном [2], на поверхности воды в которых поддерживали освещённость на уровне 12–20 кЛк. Температуру не регулировали, и в объёмах установки в ноябре — марте она колебалась в пределах 17–19 °С, в апреле — октябре составляла от 20 до 27 °С, а в аквариуме всегда была на 1–2 °С ниже. Стартовой питательной средой А служила фильтрованная прибрежная черноморская вода солёностью 17–18 ‰, доведённая с помощью поваренной соли до 26 ‰, с добавлением азота из расчёта 4.8 мг/л в виде NaNO_3 (либо KNO_3) и фосфора — 0.8 мг/л в виде KH_2PO_4 . Её меняли ежедневно или 3 раза в неделю. В качестве исследуемого материала в экспериментах 1 и 2 использовали гелидиум, собранный 05.10.2006 г. на глубине до 1 м с тетраподов берегоукрепительных сооружений правого берега бухты Карантинная (Чёрное море, Севастополь), который содержали в аквариуме в течение 112 суток. В качестве стимуляторов роста в питательную среду добавляли 2 формы хелатированного железа: хлорного ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) в концентрации 0.35 — 0.70 — 1.04 мг железа на литр среды или сернокислого ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) — 0.46 — 0.93 — 1.39 мг/л с добавлением 8 г $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ на 1 г соли каждой формы, в результате которых определили оптимальную форму железа и её концентрацию. В последующих экспериментах к среде А

на 1 л добавляли 0.5 г хелатированного хлорного железа — среда Б, на фоне которой испытывали влияние молибдена (от 0.006 до 0.900 мг/л в виде $\text{NH}_4\text{Mo}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), меди (от 0.04 до 0.12 мг/л в виде $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) и магния (от 40 до 120 мг/л в виде $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

В качестве выходных параметров использовали прирост биомассы, содержание агара, R-фикоэритрина, хлорофилла-а, общих каротиноидов и среднюю удельную скорость весового роста, которую вычисляли по формуле:

$$\mu = \frac{\ln W_t - \ln W_0}{t}, \quad (1)$$

где W_0 — начальная масса (г), W_t — конечная масса (г), t — время между взвешиваниями в сутках, которое могло меняться от 4 до 12 суток.

Сырую биомассу водорослей определяли с точностью до 10 мг после стряхивания воды и последующего неоднократного промокания таллонов между листами фильтровальной бумаги до момента, когда максимальные пятна от воды становились диаметром не более 2 мм, а их суммарная площадь не превышала 2 % от площади, занимаемой талломами. Суммарные каротиноиды и хлорофилл-а экстрагировали из одной навески хлороформэтаноловой смесью (2:1) и определяли по методике ИнБЮМ [10], выделение агара осуществляли путём щелочной [9], а R-фикоэритрина — водной экстракции [11].

Планирование и обработку результатов экспериментов осуществляли в соответствии с теорией планирования эксперимента при поиске оптимальных условий [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты 1 (объёмы 1–4, табл. 1) и 2 (объёмы 5–8) были проведены с 25.01.2007 по 27.02.2007 г. при начальном весе $W_0 = 5$ г. Полученные данные свидетельствуют о том, что гелидиум в объёмах без добавок железа (1 и 5) практически не прибавлял в весе в первую неделю культивирования. Максимальные величины « μ », зафиксированные за промежуток с 1 по 13 февраля 2007 г. (1.0–1.1), в три с лишним раза меньше величин « μ », характеризующих рост в объёмах с добавлением железа. На последних циклах эксперимента это различие увеличилось до 5–6 раз. В итоге прирост биомассы в объёмах 1 и 5 составил всего 1.22 и 1.44 г, а в объёмах 6 и 2 — 7.8 и 8.42 г. Таким образом, оптимальный диапазон концентрации железа был определён нами в пределах 0.35–0.50 мг/л.

В табл. 2 представлены результаты измерений содержания агара, R-фикоэритрина, каротиноидов и хлорофилла в пробах гелидиума, отобранных в конце экспериментов 1 и 2.

Данные табл. 1 и 2 свидетельствуют, что для обоих видов железа зависимости удельной скорости весового роста гелидиума и содержания хлорофилла и каротиноидов от концентрации железа в питательной среде имеют общую тенденцию. Оба первых уровня концентраций железа дают резкое увеличение всех трёх величин, а дальнейшее их

Таблица 1. Первый этап экспериментов 1 и 2 (начало 25.01.2007 г., $W_0 = 5$ г)**Table 1.** The first stage of experiments 1 and 2 (the beginning at 25.01.2007, $W_0 = 5$ g)

№	C_{Fe} , мг/л		01.02.2007		13.02.2007		20.02.2007		27.02.2007		$\mu_{33} \times 10^2$	+ W_{33} , (г)
	SO_4	Cl_3	W_t , (г)	$\mu_7 \times 10^2$	W_t , (г)	$\mu_7 \times 10^2$	W_t , (г)	$\mu_7 \times 10^3$	W_t , (г)	$\mu_7 \times 10^2$		
1	0	0	5.02	0.06	5.65	1.0	5.95	0.7	6.22	0.6	0.7	1.22
2	0	0.35	5.49	1.30	8.14	3.3	10.75	4.0	13.42	3.2	3.0	8.42
3	0	0.70	5.30	0.80	7.49	2.9	9.75	3.8	12.10	3.1	2.7	7.10
4	0	1.04	5.22	0.60	7.74	3.3	10.40	4.2	12.57	2.7	2.8	7.57
5	0	0	5.05	0.14	5.77	1.1	6.20	1.0	6.44	0.5	0.8	1.44
6	0.46	0	5.27	0.76	7.75	3.2	10.06	3.7	12.80	3.4	2.8	7.80
7	0.93	0	5.30	0.80	7.57	3.0	9.77	3.6	11.84	2.7	2.6	6.84
8	1.39	0	5.15	0.40	7.35	3.2	9.25	3.3	11.13	2.6	2.4	6.13

увеличение приводит либо к снижению, либо к выходу их на плато. В противофазе этим данным находятся изменения концентраций R-фикоэритрина, что вполне соответствует данным, полученным нами в экспериментах с грацилярией [5].

Зависимость содержания агара от концентрации железа аналогична для обеих форм железа, но она не поддается объяснению с позиций тех представлений, что функция накопления агара должна отставать от функции ускорения роста [6]. Можно лишь говорить о тенденции увеличения накопления агара на 20–60 % с ростом концентрации железа в питательной среде.

Эксперименты 1 и 2, продолженные до 22.10.2007 г., показали, что микродобавки хелатированного железа не только стимулируют темпы роста, но и способствуют продолжительному сохранению жизнеспособности гелидиума в условиях интенсивного культивирования [3], поэтому в дальнейших исследованиях использовали среду Б — среду А, обогащенную хелатированным хлорным железом из расчёта 0.5 мг/л.

Целью эксперимента 3 было выявление на фоне среды Б влияния микродобавок молибдена (0.006 — 0.012 —

0.018 мг/л) на ростовые функции гелидиума (табл. 3) и содержание агара и пигментов (табл. 4). Исследовали также влияние продолжительности контакта с такой средой на выходные параметры.

Культивирование гелидиума проводили в течение 7 недель. По окончании трёх недель из объёмов 4 и 8 биомассы гелидиума были изъяты для измерений содержания агара и пигментов и заменены на 6 г водорослей, находящихся в аквариуме без добавления биогенов при пониженной освещённости (0.3–0.5 кЛк в дневное время). При этом в остальных объёмах вес гелидиума также приводили к исходному $W_0 = 6$ г. Аналогичным образом поступали в последующие недели. По окончании четвёртой недели заменили гелидиум в объёмах 3 и 7, пятой — в объёмах 2 и 6, шестой — в объёмах 1 и 5. Так были получены пробы с разным временем нахождения в питательной среде, содержащей микроэлементы железа и молибдена.

Анализ результатов весового роста показал, что в пяти объёмах, где отсутствовали микродобавки молибдена, по окончании трёх недель культивирования (28.07.2011 г.) вес гелидиума колебался от 6.95 до 8.15 г ($W_{cp} = 7.63$ г). Поэтому максимальное значение веса, равное 7.35 г, в

Таблица 2. Содержание агара и пигментов в гелидиуме из экспериментов 1 и 2 (25.01.2007–27.02.2007 г.)**Table 2.** The content of the agar and pigments in gelidium in experiments 1 and 2 (25.01.2007–27.02.2007)

№ объёма	% абсолютно сухого в-ва (АСВ)			мкг/г Кр
	Агар	R-фэ	Хл-а	
1	12	0.91±0.10	0.04±0.006	173±20
2	20	0.43±0.08	0.12±0.005	545±06
3	13	0.40±0.07	0.10±0.005	489±40
4	31	0.56±0.09	0.10±0.010	419±46
5	19	0.72±0.03	0.045±0.005	170±03
6	21	0.57±0.04	0.09±0.008	438±32
7	16	0.68±0.01	0.10±0.000	471±10
8	33	0.77±0.09	0.09±0.005	431±30

Таблица 3. Рост гелидиума в эксперименте 3 (начало 07.07.2011 г., $W_0 = 6$ г)**Table 3.** The growth of gelidium in experiment 3 (the beginning at 07.07.2011, $W_0 = 6$ g)

№	Mo, мкг/л	W_t (г)							$\mu \times 1000$						
		14.07	21.07	28.07	04.08	11.08	18.08	26.08	μ_1	μ_2	μ_3	μ_4	μ_5	μ_6	μ_7
1	0	6.22	6.70	7.55	6.88	6.95	7.05	6.80	5	10	17	20	21	23	16
5	18	6.24	6.87	7.35	6.48	6.77	6.74	6.48	6	14	10	11	17	17	10
2	0	6.18	6.97	8.05	6.90	6.84	6.97	7.20	4	17	21	20	19	21	23
6	12	6.20	6.60	7.15	6.80	6.89	6.79	7.40	5	9	11	18	20	18	26
3	0	6.30	6.97	8.15	6.88	6.10	6.92	7.20	7	14	22	20	2	20	23
7	6	6.19	6.81	7.34	6.24	6.19	6.72	6.43	4	14	11	6	4	16	9
4	0	6.35	6.82	7.45	6.35	6.50	6.84	6.90	8	10	13	8	11	19	17
8	0	6.22	6.58	6.95	6.37	6.51	6.60	6.85	5	8	8	9	12	14	17

Таблица 4. Содержание агара и пигментов в гелидиуме из эксперимента 3 (07.07.2011–26.08.2011 г.)**Table 4.** The content of agar and pigments in gelidium from experiment 3 (07.07.2011–26.08.2011)

№ проб	№ объёма	Mo, мг/л	T, Нед.	Агар, % АСВ	R-фэ, % АСВ	Кр, мкг/г	Хл-а, % АСВ
1	M*	0	0	31.8	1.90±0.20	559±46	0.14±0.01
3	M**	0	0	24.0	—	—	—
5	8	0	3	28.3	—	—	—
6	3	0	3	26.1	—	—	—
8	7	0	4	26.1	2.70±0.20	517±20	0.12±0.01
9	6	06	4	19.9	1.04±0.16	1303±82	0.25±0.07
14	2	12	5	27.5	1.10±0.16	850±86	0.24±0.03
15	5	0	5	27.0	2.40±0.05	620±17	0.14±0.01
20	5	18	6	25.2	1.10±0.10	1163±71	0.29±0.02
21	1	0	6	22.4	2.80±0.30	554±48	0.12±0.01
22	1	0	1	23.4	0.77±0.07	867±14	0.27±0.05
23	5	18	1	24.8	0.55±0.07	846±80	0.23±0.03
24	2	0	2	24.3	0.82±0.09	551±18	0.12±0.02
25	6	12	2	28.9	0.84±0.06	763±14	0.19±0.02
26	3	0	3	24.2	0.90±0.04	806±40	0.20±0.03
27	7	6	3	24.9	0.96±0.10	694±83	0.17±0.03
28	4	0	4	25.2	1.10±0.05	973±16	0.24±0.04
29	8	0	4	26.5	1.10±0.10	1001±14	0.19±0.02

Примечание: M* — гелидиум из моря 02.07.2011 г. M** — гелидиум из моря 23.07.2011 г.

объёме 5 с максимальным количеством молибдена позволяет сделать вывод об отсутствии какого-либо влияния микродобавок молибдена в выбранном диапазоне варьирования на весовой рост культивируемого гелидиума.

Объединив 10 проб — с № 5 по № 29, где молибден отсутствовал (табл. 4), — получим $C_A = 25.35 \pm 2.95$ %, а т. к. среднее по шести пробам с молибденом (25.2 %) вписывается в пределы ошибок измерений, можно также констатировать и отсутствие его влияния на содержание агара. Аналогичное сравнение в отношении R-фикоэритрина показывает, что наличие молибдена в питательной среде снижает его содержание на 40 %. Для каротиноидов и хлоро-

филла — наоборот: их содержание увеличивается на 30 %.

По полученному массиву данных не удалось выявить закономерности влияния продолжительности культивирования в среде Б, содержащей молибден, на уровень содержания агара, но она существенно повлияла на увеличение концентрации фикоэритрина — с 0.66 % после 1-й недели культивирования до 1.95 % после 6-й — и обозначила положительные тренды содержания каротиноидов и хлорофилла.

В эксперименте 4 (табл. 5) на фоне среды Б исследовали влияние на удельную скорость весового роста повышенных концентраций молибдена в питательной среде

Таблица 5. Рост гелидиума в эксперименте 4 (начало 31.08.2011 г., $W_0 = 4$ г)**Table 5.** The growth of gelidium in experiment 4 (the beginning at 31.08.2011, $W_0 = 4$ g)

№ объёма	Гелидиум			Mo, мг/л	Измерение массы W_t (г)				$\mu \times 1000$			
	Э	Г	Х		08.09	16.09	23.09	30.09	μ_8	μ_8	μ_7	μ_7
1	+	-	-	0	4.60	6.16	7.82	9.52	17	37	34	28
5	+	-	-	0.9	4.50	6.24	7.22	8.62	14	40	21	25
2	-	+	-	0	4.38	5.55	7.12	9.50	11	30	36	41
6	-	+	-	0.6	4.35	5.16	5.75	7.30	10	21	15	34
3	-	-	+	0	4.42	5.57	6.77	7.60	12.5	29	28	16
7	-	-	+	0.3	4.43	5.94	7.57	9.18	13	37	35	28
4	-	-	+	0	4.42	5.73	6.97	8.43	12.5	32	28	27
8	-	-	+	0	4.17	5.20	6.32	7.67	5	27	28	28

Таблица 6. Рост гелидиума в экспериментах 5 и 6 (начало 15.10.2012 г., $W_0 = 3$ г)**Table 6.** The growth of gelidium in experiments 5 and 6 (the beginning at 15.10.2012, $W_0 = 3$ g)

№ объёма	C, мг/л		Измерение массы W_t (г)					Удельная скорость роста $\mu \times 1000$				
	Cu	Mg	24.10	31.10	07.11	(5 г) 14.11	22.11	μ_9	μ_7	μ_7	μ_{7-8}	μ_{7-8}
1	0.12	0	4.02	6.08	•8.25	*10.50	•6.37	32	59	43	26	35
2	0.08	0	4.25	6.24	•9.50	*11.80	•6.15	39	55	53	27	30
3	0.04	0	4.31	6.75	•10.14	*11.54	•5.72	40	64	51	16	19
4	0	0	4.05	5.85	•8.85	•10.70	•6.76	33	53	52	27	38
5	0	120	4.18	6.72	•10.05	•12.72	7.48	37	68	50	34	58
6	0	80	4.20	6.74	9.85	12.41	6.80	37	67	54	33	38
7	0	40	4.20	6.42	9.60	12.34	7.24	37	61	57	36	46
8	0	0	4.28	6.23	8.60	9.5	6.77	39	54	46	14	38

Примечание: •8.25 — взвешивание спустя сутки; *10.50 — спустя двое суток; (5 г) 14.11 — уменьшение веса гелидиума до 5 г и отбор проб на пигменты

Таблица 7. Содержание пигментов в гелидиуме из экспериментов 5 и 6**Table 7.** The content of pigments in gelidium from experiments 5 and 6

№ объёма	R-фэ, мг/г	Каротиноиды, мкг/г	Хл-а, мг/г
1	6.8±1.5	283±70	0.72±0.06
2	9.2±1.8	235±21	0.57±0.06
3	14.0±0.9	223±15	0.62±0.01
4	9.1±0.7	323±65	0.75±0.11
5	18.3±1.2	978±127	1.70±0.30
6	17.0±1.2	1044±53	1.90±0.09
7	12.0±0.9	871±83	1.50±0.10
8	13.0±0.5	608±39	1.10±0.09

(0.3, 0.6 и 0.9 мг/л). Испытывали гелидиум с тремя предысториями: в объёмах 1 и 5 — после проведения эксперимента 3 (Э), в объёмах 2 и 6 — собранный с тетраподов (Т), в объёмах 3, 4, 7 и 8 — собранный в Херсонесе (Х). Как это уже подтверждалось не раз, водоросли, адаптированные к культивированию в предыдущих экспериментах, проявляли более высокие темпы роста по сравнению с вновь собранными.

Гелидиум в объёме 7 с концентрацией молибдена 0.3 мг/л на протяжении всего эксперимента рос лучше, чем в объёмах 3, 4 и 8 без молибдена, в среднем на 16 %, а в объёмах 5 (0.9 мг/л) и 6 (0.6 мг/л) результат оказался хуже, чем в объёмах 1 и 2 с аналогичным гелидиумом, где отсутствовал молибден.

Таким образом, с одной стороны, микродобавки молибдена порядка 0.02 мг/л могут снижать в 1.4–2.0 раза содержание фикоэритрина и во столько же увеличивать содержание каротиноидов и хлорофилла, с другой стороны, в пределах до 0.3 мг/л они могут улучшать ростовые характеристики культивируемого гелидиума. Поэтому в зависимости от целей культивирования можно подбирать концентрацию молибдена в диапазоне 0.03–0.30 мг/л либо вовсе не включать его в состав питательной смеси.

Эксперимент с 15.10.2012 по 29.11.2012 г. состоял из двух однофакторных экспериментов — 5 и 6, при этом в пятом на фоне среды Б испытывали влияние трёх уровней микродобавок меди в виде $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.04 — 0.08 — 0.12 мг/л), а в шестом — магния в виде $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (40 — 80 — 120 мг/л). Объёмы 4 и 8 — контроль. Измерения массы гелидиума и вычисления « μ » представлены в табл. 6, а содержание пигментов — в табл. 7.

Данные табл. 6 свидетельствуют о том, что в первую неделю на этапе адаптации объекта к культуре различия в скоростях роста гелидиума неощутимы. Максимальные удельные скорости весового роста, явно превысившие фоновые, проявились на второй неделе культивирования, а значительные различия по массе — на третьей и четвёртой. Поскольку третью (07.11.2012 г.) и последующие съёмки не удалось провести синхронно, сравнение вели по величине « μ ». По результатам второй съёмки измерения биомассы (31.10.2012 г.), за 16 суток культивирования только первый уровень добавок меди оказал значимое влияние на величину « μ »: +16.0; +4.8 и +0.9 %. После четвёртой съёмки (14.11.2012–16.11.2012 г.) этот эффект выглядел так: +6, +7.8 и -1.5 %. Соответственно, влияние магния выглядело следующим образом: +9.1, +15.9, +15.3 %; +18.6, +19.1, +17.4 %. Положительный эффект магния на величину « μ » сохранился и после приведения массы к $W = 5$ г (+22.5, +1.5 и +52.1 %) а влияние добавок меди было отрицательным (-49.2, -21.7 и -8.4 %).

Данные табл. 7 в целом свидетельствуют о положительном влиянии магния и отрицательном влиянии меди на накопление пигментов. Зависимости содержания каротиноидов и хлорофилла от концентрации магния идентичны: добавка 40 мг/л в 1.4 раза увеличивает содержание хлоро-

филла и в 1.9 раза — содержание каротиноидов, 80 мг/л — в 1.76 и 2.2 раза, 120 мг/л — в 1.57 и 2.1 раза соответственно. По отношению к содержанию фикоэритрина этот эффект выглядит так: 1.09 (что лежит в пределах отклонения от среднего без магния), 1.54 и 1.66 раза.

Все три уровня добавок меди отрицательно повлияли на содержание пигментов за исключением одной точки, отражающей изменение содержания фикоэритрина в объёме 3 с концентрацией 0.04 мг/л: +26.7; -16.7 и -38 %. Интересно, что в этом объёме в течение первых 23 суток культивирования наблюдались также заметные приросты биомассы и, соответственно, величины « μ ». Уменьшение содержания каротиноидов произошло на 52.1, 49.5 и 39.5 %, а хлорофилла — на 42.6, 47.2 и 33.3 %.

Учтя полученные результаты, исследования влияния добавок меди и магния продолжили в окрестностях их первых уровней. С 17.05.2013 по 21.06.2013 г. провели полный факторный эксперимент 7 (ПФЭ типа 2²), который учитывал не только влияние каждого из двух факторов, но и их взаимодействие. Факторы варьировали на двух уровнях: медь — 0 (-) и 0.05 (+) мг/л, магний — 0 и 50 мг/л. Фон по азоту, фосфору и железу был прежним. Испытуемый материал был собран 17.04.2013 г. Исходная биомасса в каждом объёме $W_0 = 4$ г (кроме объёма 4) (табл. 8). После двух недель культивирования массу гелидиума во всех объёмах привели к исходной ($W_0 = 4$ г) и произвели отбор проб на исследование содержания пигментов (табл. 9).

Линейные модели, построенные по данным табл. 8 за 24.05.2013 и 31.05.2013 г., показали, что средняя величина « μ » (b_0) возросла с 0.023 до 0.036, влияния элементов меняли знаки, но их взаимодействие было положительным в обоих случаях, что говорит о процессе адаптации исходного материала к условиям культивирования и неравномерности роста талломов гелидиума. В суммарном итоге за 14 суток оба элемента оказали отрицательное воздействие на ростовые функции:

$$\mu_{14} = 0.0292 - 0.0006Mg - 0.0030Cu + 0.0020Mg \cdot Cu \quad (2)$$

Коэффициент b_1 при Mg составляет всего 2 % от среднего, и при 5 % уровне значимости этим слагаемым можно пренебречь, но добавки меди (b_2) значимо снизили среднее значение « μ » (-10 %), а коэффициент b_3 , отражающий их взаимодействие, даёт прибавку около 7 %. Это говорит о сложности характера взаимодействия элементов с учётом того, что в предыдущих двух однофакторных экспериментах оба фактора первые 4 недели оказывали положительно влияние на величину « μ ». Более логичными выглядят результаты после 3-й недели культивирования, которое было проведено после отбраковки исходного материала:

$$\mu_7^3 = 0.0573 + 0.0055Mg + 0.0020Cu + 0.0008Mg \cdot Cu, \quad (3)$$

где значимым является только положительное влияние магния (+9.6 %).

Таблица 8. Рост гелидиума в эксперименте 7 (начало 17.05.2013 г., $W_0 = 4$ г)**Table 8.** The growth of gelidium in experiment 7 (the beginning at 17.05.13, $W_0 = 4$ g)

№ объёма	Уровни		Измерение массы W_t					Удельная скорость роста $\mu_7 \times 1000$				
	Mg	Cu	24.05	31.05	07.06	14.06	21.06	24.05	31.05	07.06	14.06	21.06
1	+	+	4.67	6.22	6.42	8.65	10.00	19	41	68	43	21
2	+	-	4.57	6.30	6.53	8.67	10.74	16	46	70	40	31
3	+	+	4.66	6.12	6.20	7.80	9.08	22	39	63	33	22
4	+	-	4.02	4.80	5.68	7.04	9.04	16	25	50	31	36
5	-	+	4.80	5.65	5.68	7.46	8.90	26	23	50	39	25
6	-	-	4.90	6.48	5.62	7.56	8.82	29	40	49	42	22
7	-	+	4.86	6.18	5.92	7.24	8.50	28	34	56	29	23
8	-	-	4.56	5.98	5.78	7.37	9.00	19	38	52	35	28.5

Примечание: 31.05* — отбор проб на пигменты и приведение массы к $W_0 = 4$; 4 — $W_0 = 3.6$ г

По итогам 4-й недели коэффициент b_2 при Cu меняет знак (-1.4 %) и на 5-й неделе вырастает до -12.6 %. Вырастает и отрицательное значение взаимодействия (до -10.3 %):

$$\mu_7^5 = 0.0261 + 0.0014Mg - 0.0033Cu - 0.0027Mg \cdot Cu. \quad (4)$$

Таким образом, если речь идёт об оптимизации ростовых функций гелидиума при длительном культивировании, из этих двух элементов можно использовать только магний.

Чтобы определить, как влияли эти добавки на содержание пигментов, отбор проб осуществили дважды — 31.05.2013 г. (индекс 1) и в конце эксперимента (индекс 2):

$$R_1\text{-фэ} = 11.71 + 4.31g + 1.11Cu + 0.31Mg \cdot Cu, \quad (5)$$

$$R_2\text{-фэ} = 10.2 + 3.2Mg - 0.04Cu + 0.39Mg \cdot Cu, \quad (6)$$

$$Kp_1 = 663 + 12Mg + 9Cu + 51Mg \cdot Cu, \quad (7)$$

$$Kp_2 = 706 + 60Mg + 8Cu + 70Mg \cdot Cu, \quad (8)$$

$$Хл\text{-}\alpha_1 = 1.09 + 0.33Mg - 0.01Cu + 0.02Mg \cdot Cu, \quad (9)$$

$$Хл\text{-}\alpha_2 = 1.29 + 0.43Mg + 0.03Cu + 0.03Mg \cdot Cu. \quad (10)$$

Из уравнений 5–10 видно, что магний положительно влияет на содержание R-фикоэритрина (+37 и 31 %),

хлорофилла-а (+30 и 33 %) и в меньшей степени — на содержание каротиноидов (+8.5 %, уравнение 8). Собственное влияние меди на содержание пигментов оказалось незначимым в 5 из 6 случаев, а из уравнения 5 видно, что в первые две недели её добавление способствовало увеличению концентрации R-фикоэритрина на 9.5 %. Согласно уравнениям 7 и 8, где непосредственное влияние меди на концентрацию каротиноидов в 5 раз меньше уровня значимости, взаимодействие с магнием даёт прибавки 7.7 и 10 %, и это необходимо учитывать, если целью культивирования будут каротиноиды.

Выводы.

1. Добавка к среде А (черноморская вода, доведённая до солёности 26 ‰, обогащённая азотом до 4.8 мг/л и фосфором — до 0.8 мг/л) хелатированного хлорного железа в количестве 50 мг/л (среда Б) не только поддерживает жизнеспособность культивируемого гелидиума в течение годового цикла, но и повышает содержание агара (C_A) на 30 %, каротиноидов (C_{Kp}) и хлорофилла-а ($C_{Хл}$) — более чем в 2 раза, однако снижает уровень фикоэритрина ($C_{Фэ}$) на 38 %, а на этапе

Таблица 9. Содержание пигментов в гелидиуме из эксперимента 7**Table 9.** The content of pigments in gelidium from experiment 7

№ объёма	R-фэ (мг/г)		Kp (мкг/г)		Хл-а (мг/г)	
	31.05	21.06	31.05	21.06	31.05	21.06
1	18.9±1.4	12.6±0.6	805±50	831±35	1.63±0.04	1.96±0.06
2	14.0±0.6	10.1±0.7	702±43	660±60	1.64±0.50	1.54±0.04
3	16±0.5	14.8±0.7	665±105	881±38	1.22±0.20	1.61±0.15
4	15.2±2.0	15.9±0.1	528±31	737±35	1.20±0.10	1.78±0.01
5	8.8±0.7	6.2±0.7	560±70	546±60	0.68±0.03	0.76±0.04
6	6.7±1.0	6.7±0.1	550±40	540±87	0.64±0.04	0.70±0.05
7	7.6±0.5	6.9±0.5	660±88	645±195	0.79±0.03	0.97±0.02
8	6.5±0.5	8.1±0.6	837±75	900±121	0.95±0.05	1.01±0.24

его адаптации к культуре увеличивает среднюю удельную скорость весового роста « μ » в 3–5 раз.

2. Добавки 0.006–0.018 мг молибдена на литр среды Б не влияют на величину « μ » и накопление в гелидииме агара, но повышают $C_{\text{КР}}$ и $C_{\text{ХЛ}}$ на 30 % и снижают на 40 % $C_{\text{ФЭ}}$. Однако в процессе 6-недельного культивирования $C_{\text{ФЭ}}$ повышается с 0.66 до 1.95 %, а добавки молибдена порядка 300 мкг/л увеличивают « μ » на 16 %.
3. Добавки 0.08–0.12 мг меди на литр среды Б приводят к уменьшению $C_{\text{КР}}$ в 1.6–2.0 раза, $C_{\text{ХЛ}}$ — в 1.5–1.9 раза, $C_{\text{ФЭ}}$ — в 1.2–1.4 раза, но при концентрации 0.04 мг/л в первые 30 суток культивирования увеличивают $C_{\text{ФЭ}}$ на 26 %, а величину « μ » — на 6–16 %.
4. Добавки 40–120 мг магния на литр среды Б способствуют увеличению « μ » на 9–19 %, содержания фикоэритрина — на 10–60 %, хлорофилла — на 40–75 % и каротиноидов — до 2 раз.
5. Продолжительное культивирование (5 недель) при одновременном обогащении среды «Б» магнием (50 мг/л) и медью (0.05 мг/л) выявляет положительное влияние магния на величину « μ » (+5.3 %), $C_{\text{ФЭ}}$ (+36.8 %), $C_{\text{ХЛ}}$ (+33 %) и $C_{\text{КР}}$ (+8.5 %), а также отрицательное влияние меди (-12.6 %) и их взаимодействия (-10.3 %) на величину « μ ». Их взаимодействие повышает $C_{\text{КР}}$ (+10 %), а при кратковременном культивировании (до двух недель) собственно медь на 9.5 % повышает $C_{\text{ФЭ}}$.

Благодарности. Авторы благодарят д-ра биол. наук Силкина В. А. (ИО ИО РАН) за предоставленные материалы по фитопланктону.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Адлер Ю. П., Маркова Е. В., Грановский Ю. В. *Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий*. Москва : Наука, 1976. 280 с. [Adler Yu. P., Markova E. V., Granovskii Yu. V. *Planirovanie eksperimenta pri poiske optimal'nykh usloviy*. Moscow: Nauka, 1976, 280 p. (in Russ.)].
2. Беляев Б. Н. Техническое обеспечение культивирования макрофитов // *Рыбное хозяйство Украины*. 2001. № 5. С. 21–24. [Belyaev B. N. Tekhnicheskoe obespechenie kul'tivirovaniya makrofitov. *Rybnoe khozyaistvo Ukrainy*, 2001, no. 5, pp. 21–24. (in Russ.)].
3. Беляев Б. Н. Перспективы интенсивного культивирования черноморской красной водоросли *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur (*Rhodophyta*) // *Рибне господарство України*. 2009. № 4. С. 13–18. [Belyaev B. N. Perspektivy intensivnogo kul'tivirovaniya chernomorskoj krasnoj vodorosli *Gelidium latifolium* (Grev.) Born. et Thur (*Rhodophyta*). *Ribne gospodarstvo Ukraini*, 2009, no. 4, pp. 13–18. (in Russ.)].
4. Беляев Б. Н., Калугина-Гутник А. А., Миронова Н. В., Пархоменко А. В. Рост *Gracilaria verrucosa* в лабораторных условиях при комбинированном влиянии факторов среды // *III Всесоюз. конф. по морской биологии* : тез. докл. (Севастополь, окт. 1988). Киев, 1988. Ч. 2. С. 197–198. [Belyaev B. N., Kalugina-Gutnik A. A., Mironova N. V., Parkhomenko A. V. Rost *Gracilaria verrucosa* v laboratornykh usloviyakh pri kombinirovannom vliyaniy faktorov sredy. In: *III Vsesoyuz. konf. po morskoi biologii*: tez. dokl. (Sevastopol, Oct. 1988). Kiev, 1988, pt. 2, pp. 197–198. (in Russ.)].
5. Беляев Б. Н., Нехорошев М. В. Перспективы получения фикоэритрина при культивировании *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (*Rhodophyta*) // *Альгология*. 2002. Т. 12, № 4. С. 481–490. [Belyaev B. N., Nekhoroshev M. V. Perspectives of phycoeritine isolation from cultures of *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. (*Rhodophyta*). *Algologiya*, 2002, vol. 12, no. 4, pp. 481–490. (in Russ.)].
6. Дзизюров В. Д., Жильцова Л. В. Возможности сопряжения функций роста и накопления в них гелеобразующих полисахаридов у двух видов агарофитов – *Ahnfeltia tobuchinsis* и *Gracilaria lichenides* // *III Всесоюз. конф. по морск. биологии* : тез. докл. (Севастополь, октябрь 1988). Киев, 1988. Ч. 2. С. 202–203. [Dzizyurov V. D., Zhil'tsova L. V. Vozmozhnosti sopryazheniya funktsii rosta i nakopleniya v nikh geleobrazuyushchikh polisakharidov u dvukh vidov agarofitov – *Ahnfeltia tobuchinsis* i *Gracilaria lichenides*. In: *III Vsesoyuz. konf. po morsk. biologii*: tez. dokl. (Sevastopol, Oct. 1988). Kiev, 1988, pt. 2, pp. 202–203. (in Russ.)].
7. Зинова А. Д. *Определитель зелёных, бурых и красных водорослей южных морей СССР*. Москва ; Ленинград : Наука, 1967. 400 с. [Zinova A. D. *Opredelitel' zelenykh, burykh i krasnykh vodoroslei yuzhnykh morei SSSR*. Moscow; Leningrad: Nauka, 1967, 400 p. (in Russ.)].
8. Калугина А. А., Грюнер В. С., Соколова Н. Н. Агар из черноморской водоросли гелидий // *Рыбное хозяйство*. 1964. № 4. С. 68–70. [Kalugina A. A., Gryuner V. S., Sokolova N. N. Agar iz chernomorskoj vodorosli gelidium. *Rybnoe khozyaistvo*, 1964, no. 4, pp. 68–70. (in Russ.)].
9. Кизиветтер И. В. и др. Производство агара при варке анфельции без добавления (беломорский агар). // *Переработка морских водорослей и других промысловых водных растений*. Москва : Пищепром, 1967. С. 100–103. [Kizivetter I. V. et al. Proizvodstvo agara pri varke anfel'tsii bez dobavleniya (belomorskii agar). In: *Pererabotka morskikh vodoroslei i drugikh promyslovykh vodnykh rastenii*. Moscow: Pishcheprom, 1967, pp. 100–103. (in Russ.)].
10. Копытов Ю. П., Дивавин И. А., Цымбал И. М. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов // *Материалы конференции «Рациональное использование ресурсов моря – важный*

- вклад в реализацию продовольственной программы». Москва, 1985. С. 227–231. Деп. в ВИНТИ № 566-850. [Kopytov Yu. P., Divavin I. A., Tsymbal I. M. Skhema kompleksnogo biokhimičeskogo analiza gidrobiontov. In: *Materialy konferentsii "Ratsional'noe ispol'zovanie resursov morya – važnyj vklad v realizaciju prodovol'stvennoj programmy"*. Moscow, 1985, pp. 227–231. Dep. VINITI no. 566-850. (in Russ.)].
11. Красновский А. А., Евстигнеев В. Б., Брин Г. П., Гаврилова В. А. Выделение фикоэритрина из красных водорослей, его спектральные и фотохимические свойства // *Доклады Академии наук СССР*. 1952. Т. 82, № 6. С. 947–950. [Krasnovskii A. A., Evstigneev V. B., Brin G. P., Gavrilova V. A. Vydelenie fikoeritrina iz krasnykh vodoroslei, ego spektral'nye i fotokhimičeskije svoistva. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 1952, vol. 82, no. 6, pp. 947–950. (in Russ.)].
 12. Скопинцев Б. А. *Химический состав вод Чёрного моря*. Ленинград : Гидрометеиздат, 1975. 336 с. [Skopintsev B. A. *Khimičeskii sostav vod Chernogo morya*. Leningrad: Gidrometeoizdat, 1975, 336 p. (in Russ.)].
 13. Стадничук И. Н. Фикобиллипротеины // *Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия*. Москва : ВИНТИ, 1990. С. 87–98. [Stadnichuk I. N. Fikobilliproteiny. In: *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Biol. khimiya*. Moscow: VINITI, 1990, pp. 87–98. (in Russ.)].
 14. Huang L. Preliminary observations on the growth of *Gelidium amansii* Lamx. in the sporelings stage. *Acta Oceanologica Sinica*, 1982, vol. 4, no. 2, pp. 223–230.
 15. Kaliaperumal N., Rao M. U. Studies on the standing crop and phycocolloid of *Gelidium pusillum* and *Pterocladia heteroplatos*. *Indian Journal of Botany*, 1981, vol. 4, no. 2, pp. 91–95.

The influence of culture medium on the quantity of agar, pigments and growth of *Gelidium spinosum* from the Black Sea

B. N. Belyaev, N. M. Beregovaya

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: belyaevbob@yandex.ru

The results of researches on the influence of additions of Fe, Mo, Mg and Cu on growth characteristics and maintenance of pigments and agar in the thallus of *Gelidium spinosum* (Grev.) Born et Thur. (*Rhodophyta*) from the Black Sea are presented. Increasing salinity of Black Sea water to 26 ‰ and enriching it with nitrogen up to 4.8 and phosphorus to 0.8 mg/l (environment A) showed that additions of chelated chloric iron in the amount of 0.5 mg/l (nourishing environment B) not only save viability of *Gelidium* during of annual cycle but also increase maintenance of agar by 30 %, total carotenoids and chlorophyll — more than 2 times, but reduce the level of phycoerythrin by 38 %, and on the stage of adaptation to the culture environment increase specific the average rate of weight-growth “ μ ” in 3–5 times. The addition in the environment B of molybdenum to 0.018 mg/l increases C_{Car} and C_{Chl} by 30 %, but reduces C_{Ph-er} at 40 %, and to 0.3 mg/l — increases “ μ ” in 18 %. Copper in environment B to 0.12 mg/l reduces the C_{Car} by 2 times, C_{Chl} — 1.9 times and C_{Ph-er} — 1.4 times, and magnesium (up to 120 mg/l) increases “ μ ” in 19 %, C_{Ph-er} — 60 %, C_{Chl} — 75 % and C_{Car} — 2 times. At the joint enriching of nourishing environment B by Mg (50 mg/l) and Cu (0.05 mcg/l) Mg assists the increase of phycoerythrin on 36.8 %, chlorophyll — on 33 %, carotenoids — on 8.5 % and “ μ ” — on 5.3 %. Cu directly increases the level of phycoerythrin on 9.5 % (during 2 weeks), diminishes “ μ ” on 12.5 % and in cooperating with Mg — yet on 10.3 % diminishes “ μ ”, but promotes the concentration of carotenoids by 10 %.

Keywords: Black Sea, *Gelidium spinosum*, red algae, mode of cultivation, productivity, biomass, micro-additives, agar, pigments