

Photosynthetic Pygments Content and Growth of Microalga *Plagioselmis prologa* (Cryptophyta) Under Low Salinity

Zh.V. Markina, N.A. Aizdaicher

*A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, Far East Branch, Russian Academy of Sciences,
Vladivostok 690041, Russia*

*E-Mail: zhannav@mail.ru

Received June 27, 2016

Low salinity influence on chlorophyll *a* and carotinoid content and growth of microalgae *Plagioselmis prologa* (Cryptophyta) was studied. It were shown, that photosynthetic content decreased under salinity 24‰, compare with control (32‰), but alga growth didn't affected. Salinity reduction to 16‰ provoked more significant lowering of the parameters compared with control. Salinity 8‰ lead to the most negative effect on the alga.

Key words: adaptation, salinity, stress, microalgae

Среди большого количества факторов, оказывающих влияние на морские одноклеточные водоросли, соленость является одним из важнейших. Стресс, вызванный ее отклонением от оптимальной для организма, приводит не только к нарушениям его физиологических процессов, но и гибели (Larcher, 2003). В связи с тем, что фотосинтетический аппарат – основной поставщик энергии растительного организма, перестройки которого в стрессовых условиях являются одним из механизмов адаптации, его состояние оценивается как критерий функционирования микроводоросли. В настоящее время часто применяемым показателем для изучения изменений фотосинтетического аппарата при неблагоприятных условиях среды и степени адаптации к ней является содержание фотосинтетических пигментов: хлорофилла *a* и каротиноидов (Fu, Bell, 2003; Haubner *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2014).

Только в лабораторном эксперименте, проводимом при стандартных условиях, можно наиболее точно оценить действие конкретного фактора среды на живой организм (Water..., 1994). В качестве объектов исследования среди одноклеточных водорослей все чаще привлекают внимание представители отдела Cryptophyta, которые играют важную экологическую роль в морях и достигают высокой численности во время “цветения” (Xing *et al.*, 2008; Šupraha *et al.*, 2014; Tas, Yılmaz, 2015).

В связи с вышеизложенным цель настоящей работы заключалась исследовании действия пониженной солености на содержание фотосинтетических пигментов

и рост криптофитовой водоросли *Plagioselmis prolonga*.

MATERIALS AND METHODS

Объектом исследования служила микроводоросль *Plagioselmis prolonga* Butch. (Cryptophyta), выделенная из Амурского залива Японского моря. В экспериментах исследовали действие морской воды соленостью 32, 24, 16, 8 и 4‰. Воду необходимой солености получали путем разведения морской воды дистиллированной (Fu, Bell, 2003). Соленость измеряли на электросолемере ГМ-65М.

Культуру выращивали на питательной среде *f*, приготовленной на основе стерилизованной морской воды соответствующей солености (Guillard, Ryther, 1962) при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещении люминесцентными лампами со свето-темновым периодом 12 ч свет: 12 ч темнота, общей освещенностью 3500 лк. За контроль принимали содержание пигментов и рост водоросли при солености 32‰.

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли стандартным методом экстракции из клеток ацетоном с последующим измерением на спектрофотометре Shimadzu-UV 2550. Расчет концентраций данных пигментов производили по стандартным формулам (Jeffrey, Humphrey, 1975).

Количество клеток водорослей подсчитывали под микроскопом Primo Star (Zeiss) в камере типа Нажотта объемом 0.044 мл.

Образцы для определения содержания пигментов и численности клеток отбирали после тщательного перемешивания суспензии в одно и то же время спустя 2 ч после окончания темного периода через 1, 4 и 7

сут опыта. Продолжительность экспериментов – семь суток. Все опыты проводили в трех повторностях.

Статистическую обработку полученных данных (средние значения, стандартное отклонение) осуществляли с помощью программы Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов у *P. prolonga* при солености 24‰ превышало таковое в контроле (32‰) до четвертых суток опыта, а на седьмые оно было ниже контрольного уровня (рис. 1). Так как динамика содержания хлорофилла *a* и каротиноидов имела сходный характер, мы будем обозначать их как фотосинтетические пигменты (ФП). Снижение солености до 16‰ приводило к еще большему уменьшению их содержания, что отмечено на всем протяжении эксперимента. Самый низкий показатель ФП отмечен при солености 8‰. При 4‰ анализ содержания хлорофилла *a* и каротиноидов не проводили вследствие недостаточного количества материала.

Динамика численности клеток коррелировала с содержанием ФП. Рост популяции водоросли при солености 32‰ соответствовал типичной *s*-образной кривой (рис. 2). Скорость роста при данных условиях была максимальной в начале эксперимента (таблица), а впоследствии постепенно уменьшалась. Время генерации, напротив, увеличивалось. Число клеток и скорость роста при 24‰ незначительно отличались от таковых в контроле на всем протяжении опыта, время генерации возрастало к седьмым суткам. Понижение солености до 16‰ приводило к уменьшению количества клеток и снижению скорости роста. Время генерации было выше в течение четырех суток опыта,

а к его завершению снижалось. При 8‰ отмечено ингибирование водоросли на всем протяжении опыта. Однако наибольшему негативному воздействию *P. prolonga* подвергался при 4‰, так численность клеток резко падала через сутки (в 10 раз по сравнению с начальной) и оставалась на крайне низком уровне в течение всей экспозиции.

Результаты наших экспериментов показали, что *P. prolonga* способен нормально расти при понижении солености до 24‰, более низкая соленость вызывала задержку роста микроводоросли и при 4‰ она находилась в крайне угнетенном состоянии. Ранее показано, что у других водорослей, например, *Attheya ussurensis* и *Corethron hystryx*, адаптации к солености от 12‰ и ниже также не происходило (Aizdaicher, Markina, 2010; Aizdaicher, Markina, 2011).

Подавление роста водорослей под воздействием факторов среды обусловлено не только их повреждающим действием, но и адаптивными ответами клеток водорослей. Медленный рост помогает им выжить в стрессовых условиях, так как в этом случае освобождаются ресурсы, необходимые для защиты от повреждающего влияния и запускаются процессы, необходимые для адапционных перестроек (Brown, 1985).

В угнетенном состоянии необходимую для жизнедеятельности энергию водоросли получают из внутренних резервов вследствие активации дыхательных процессов, повышения активности гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов. Накопление белка в клетках на фоне слабого роста при пониженной солености происходит не для использования его при делении, а для

адаптации к изменившейся солености. Осмотические настройки, защита макромолекул клетки, ускорение процессов накопления азота, подавление активности свободных радикалов – предполагаемые функции белков в условиях стресса (Pal *et al.*, 2013). Косвенным свидетельством перестройки белкового комплекса является изменение качественного и количественного состава пигментов (Gilmour *et al.*, 1984; Tamam *et al.*, 2011). Перестройка пигментного комплекса при

негативном влиянии начинает происходить, в большинстве случаев, минимум через сутки, параллельно снижается интенсивность фотосинтеза и фотохимическая активность хлорофилла. В дальнейшем содержание ФП может снижаться в два и более раза по сравнению с контролем (Dieguez-Rojo, Gonzalez, 2003), что зафиксировано и в наших опытах при солености 16 – 8‰.

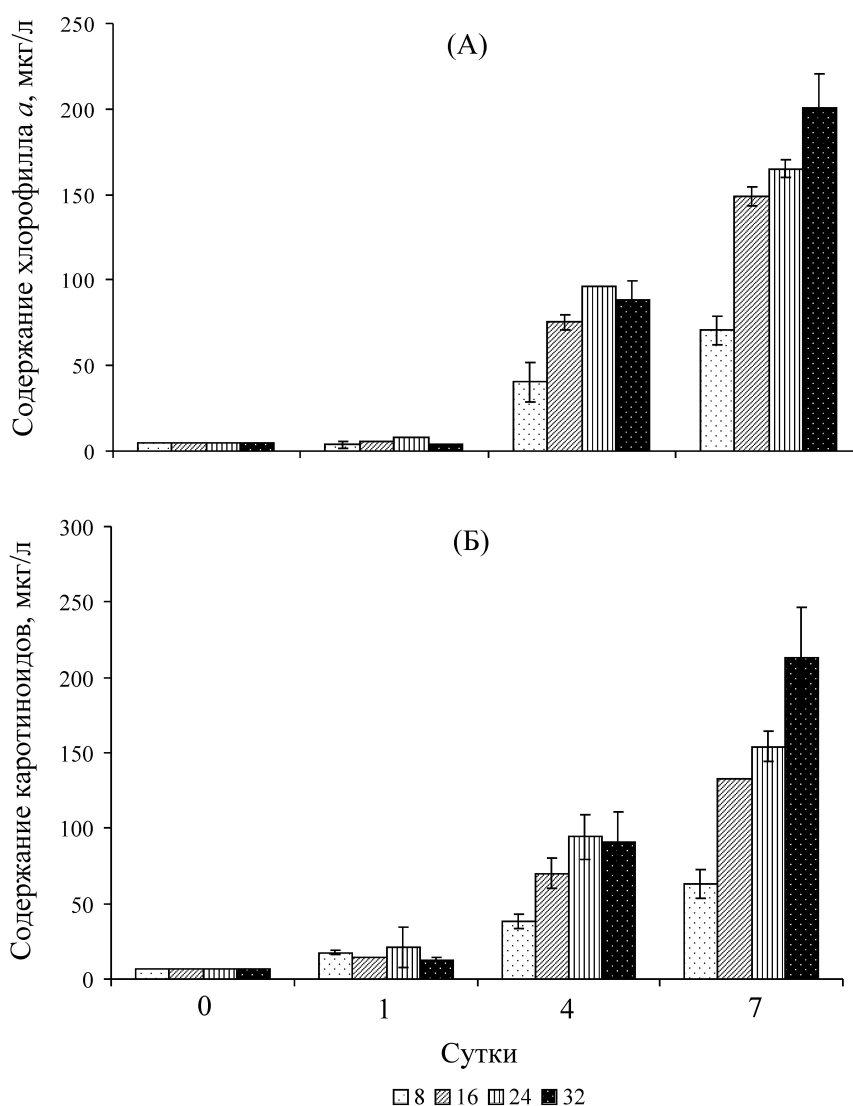
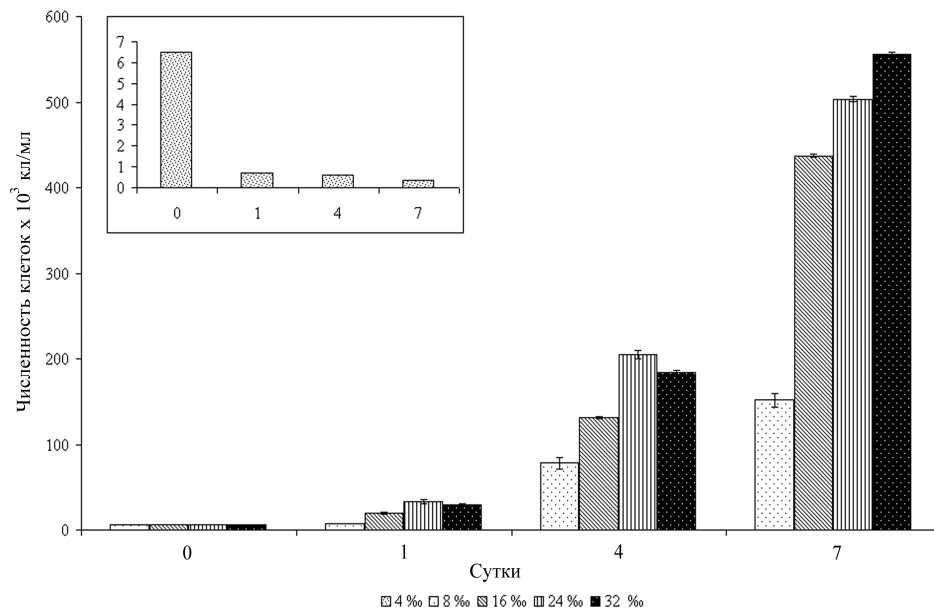


Figure 1. Содержание фотосинтетических пигментов *Plagioselmis prolunga* при различной солености: (А) – хлорофилла а, (Б) – каротиноидов.

Table 1. Скорость роста и время генерации у *Plagioselmis prolonga*.

Показатель	Сутки	Соленость, ‰				
		4	8	16	24	32
Скорость роста, дел/сут	1	0	0,2	1,1	1,6	1,5
	4	0	0,8	0,6	0,6	0,6
	7	0	0,2	0,4	0,3	0,4
Время генерации, ч	1	0	99,1	15,0	10,3	11,1
	4	0	21,5	26,3	27,2	27,0
	7	0	75,2	41,5	55,7	45,3

**Figure 2.** Динамика численности клеток *Plagioselmis prolonga* при различной солености.

До настоящего времени механизмы влияния опреснения на ФП морских планктонных водорослей окончательно не выяснены, однако показано, что при гипотоническом стрессе подавляются первичные процессы I и II фотосистем, нарушаются цикл фиксации диоксида углерода, ингибируется электронный транспорт (Gilmour *et al.*, 1984; Häubner *et al.*, 2014). Известно, что неблагоприятное действие любого фактора может проявляться через непосредственное разрушение и нарушение реакций синтеза хлорофилла *a*, а так же вследствие

деградации каротиноидов, выступающих в качестве защитных пигментов (Dieguez-Rojo, Gonzalez, 2003). Возможно, снижение уровня содержания каротиноидов, наблюдаемое в нашем эксперименте, спровоцировало разрушение молекул хлорофилла *a*. Мы предполагаем, что, при пониженной солености разрушение мембран хлоропластов приводит к дезорганизации хлорофилл-белковых комплексов, а также окислению пигмента на свету и снижению его количества.

В.В. Хлебович (Khlebovich, 1968) показал, что

соленость 5–8‰ является критической для большинства морских организмов. Как свидетельствуют наши результаты, *P. prolonga* не способен нормально расти в данном диапазоне солености. Чувствительность водоросли, возможно, обусловлена отсутствием или слабой работой механизмов осморегуляции, которые включают в себя изменение активности ферментов (Pal *et al.*, 2013), соотношения содержания жирных кислот (Xu, Beardall, 1997), аминокислот (Liu *et al.*, 2000), накопление и выделение в среду различных органических веществ (Rijstenbil, Sinke, 1989; Jackson *et al.*, 1992).

Таким образом, у *P. prolonga* отсутствует полноценная адаптация к понижению солености и в результате происходит уменьшение содержания ФП и замедление роста по сравнению с контролем. Повреждающее действие фактора усиливается с его уменьшением, что особенно выражено при 4‰.

REFERENCES

- Aizdaicher N.A., Markina Zh.V. (2010) The effect of decrease in salinity on the dynamics of abundance and the cell size of *Corethron hystrix* (Bacillariophyta) in laboratory culture. *Ocean Sci. J.*, **45**, 1-5.
- Aizdaicher N.A., Markina Zh.V. (2011) Influence of changes in sea water salinity on the growth, photosynthetic pigment content, and cell size of the benthic alga *Attheya ussuriensis* Stonik, Orlova et Crawford, 2006 (Bacillariophyta). *Russian J. of Mar. Biol.*, **37**, 472 – 477.
- Gilmour D.J., Hipkins M.F., Boney A.D. (1984) The effect of salinity on the primary processes of photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *J. Exp. Bot.*, **35**, 28-35.
- Guillard R.R.L., Ryther J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239.
- Dieguez-Rojo E., Gonzalez L. (2003) Effects of allelochemical 2-benzoxazolinone on growth, pigment content and cell appearance of *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butch. *Thalassas.*, **19**, 13-22.
- Fu F.-X., Bell P.R.F. (2003) Effect of salinity on growth, pigmentation, N₂ fixation and alkaline phosphatase activity of cultured *Trichodesmium* sp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **257**, 69-76.
- Häubner N., Sylvander P., Vuori K., Snoeijs P. (2014) Abiotic stress modified the synthesis of alpha-tocopherol and beta-carotene in phytoplankton species. *J. Phycol.*, **50**, 753-759.
- Jackson A.T., Ayer S.W., Laycock M.V. (1992) The effect of salinity on growth and amino acid composition in the marine diatom *Nitzschia pungens* Can. *J. Bot.*, **70**, 2198-2201.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c, and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pfl.*, **167**, 191-194.
- Khlebovich V.V. (1968) Some peculiar features of the hydrochemical regime and the fauna of mesohaline waters. *Marine Biol.*, **2(1)**. 47-49.
- Larcher W. (2003) Physiological plant ecology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Liang Y., Cao C., Tian C., Sun M. (2014) Changes in cell density and chlorophyll fluorescence with salinity

- stress in two *Isochrysis galbana* strains (Prymnesiophyceae). *Algol. Stud.*, **145-146**, 81-98.
- Liu C.H., Shih M.C., Lee T.M. (2000) Free proline levels in *Ulva* (Chlorophyta) in response to hypersalinity: elevated NaCl in seawater versus concentrated seawater. *J. Phycol.*, **36**, 118-119.
- Pal D, Khozin-Goldberg I, Didi-Cohen S, Solovchenko A, Batushansky A, Kaye Y, Sikron N, Samani T, Fait A, Boussiba S. (2013) Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 8291-8306.
- Rijstenbil J.W., Sinke J.J. (1989) The influence of salinity fluctuation on the ammonium metabolism of the marine diatom *Skeletonema costatum* grown in continuous culture. *J. Plankton Res.*, **11**, 297-315.
- Šupraha L., Bosak S., Ljubešić Z., Viličić D. (2014) Cryptophyte bloom in a Mediterranean estuary: High abundance of *Plagioselmis* cf. *prolonga* in the Krka River estuary (eastern Adriatic Sea). *Scientia marina*, **78**, 319-328.
- Tammam A.A., Fakhry E.M., El-Sheekh M. (2011) Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *AJB*, **10**, 3795-3808.
- Tas S., Yilmaz I.N. (2015) Potentially harmful microalgae and algal blooms in a eutrophic estuary in the Sea of Marmara (Turkey). *Medit. Mar. Sci.*, **16**, 432-443.
- Xing X.-L., Lin X.-Y., Chen C.-P., Gao Y.-H., Liang J.-R., Huang H.-Z., Li B.-Q., Ho K.-C., Qi Y.-Z. (2008) Observations of several cryptomonad flagellates from China Sea by scanning electron microscopy. *J. Syst. Evol.*, **46**, 205-212.
- Xu X.-Q., Beardall J. (1997) Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an Antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry*, **45**, 655-658.
- Water quality. (1994) Algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. Draft International Standard ISO/DIS 10253.2.