

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДИНОФИТОВОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *PROROCENTRUM NANUM*

И. А. Харчук, Н. В. Поспелова

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, РФ,
seaferm@yandex.ru

Виды рода *Prorocentrum* применяются в качестве корма в аквакультуре. В связи с тем, что пищевая ценность микроводорослей в аквакультуре определяется содержанием и соотношением биохимических компонентов, исследовано содержание белков, углеводов, нуклеиновых кислот и пигментов динофитовой микроводоросли *Prorocentrum nanum*. Отмечено высокое содержание белков, суммарных углеводов (в частности, резервных). Одним из доминирующих каротиноидных пигментов является фукоксантин. Биохимический состав *P. nanum* позволяет использовать ее в качестве кормового объекта при культивировании морских беспозвоночных.

Ключевые слова: *Prorocentrum nanum*, биохимический состав, каротиноиды, фукоксантин, биотехнология, аквакультура

Динофитовые водоросли являются одной из основных групп фитопланктона Чёрного моря, которым принадлежит первое место в пищевых взаимоотношениях планктонных организмов. Эта группа водорослей доминирует в спектре питания черноморских культивируемых моллюсков-фильтраторов, при этом преобладают клетки рода *Prorocentrum* [1]. Известно, что виды этого рода применяются в качестве корма при выращивании моллюсков, копепод, а максимальная их численность в море совпадает с периодами наибольшего содержания углеводов и липидов в теле культивируемых мидий [2]. Одним из представителей рода *Prorocentrum* является *P. nanum*, который представляет интерес благодаря ряду характеристик: малый размер клеток (8–10 мкм), что важно при питании личиночных стадий планктонных животных; не продуцирует биотоксины в отличие от других представителей данного рода; обладает широким спектром биологически активных веществ [3]. Работы по культивированию, исследованию биохимического состава *P. nanum* единичны [3, 4]. В связи с тем, что пищевая ценность микроводорослей в аквакультуре определяется содержанием и соотношением биохимических компонентов, а также доступностью клеток для питания гидробионтов, этот вид может быть рассмотрен как перспективный объект для аквакультуры и биотехнологии.

Целью данной работы было исследование биохимических компонентов клеток динофитовой водоросли *P. nanum*.

Материал и методы. Объект исследования – динофитовая микроводоросль *P. nanum* J. Schiller (Dinophyta) из коллекции культур ИМБИ РАН (штамм IBSS-62.). Выращивали её в режиме накопительной культуры, в конических колбах V = 0,5 л с объемом суспензии 450 мл при постоянном круглосуточном освещении и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя культуры. Интенсивность света на поверхности раствора составляла 15 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 25–29 °C. В качестве питательной среды для *P. nanum* использовали смесь сред Тренкеншу и F/2 (1:1).

На стационарной фазе роста клетки концентрировали центрифугированием при 3000 об./мин на лабораторной центрифуге. Влажность в обезвоженных культурах определяли стандартным методом [5]. Пробы обрабатывали по схеме комплексного химиче-

ского анализа гидробионтов [6]. Массовую долю белка в водорослях определяли по методике Лоури [7], содержание пигментов, свободных нуклеотидов (СН), РНК и ДНК – спектрофотометрически на приборе СФ–2000 [8, 9, 10]. Общее содержание липидов находили спектрофотометрическим методом с фосфованилиновым реактивом [11]. Определение углеводов проводили по методике Агатовой А. И. (2004) с L-триптофановым реактивом [11]. Регистрируемые показатели биохимического состава выражали в пересчете на сухую массу. Для определения качественного и количественного состава каротиноидов биомассу водорослей отделяли от питательной среды и отмывали водой от остатков солей с помощью центрифугирования в течение 10–15 мин. при 3000 об./мин. Пигменты экстрагировали 100 % ацетоном для определения содержания хлорофилла, хлороформ-метанолом (2:1) – для определения количественного и качественного состава каротиноидов. Концентрацию хлорофиллов (хл.) и каротиноидов (кр.) (мг/г) рассчитывали по уравнениям [10, 12, 13] (для 90%-ных ацетоновых экстрактов). Качественный состав каротиноидов *P. nanum* определяли по [13]. Спектры поглощения фракций пигментов в ацетоне регистрировали в диапазоне длин волн 400–800 нм на спектрофотометре. Идентификацию каротиноидов проводили по хроматографическим показателям (Rf) и спектральным характеристикам пигментов [13]. Параллельно на пластину наносили стандарт фукоксантина, подготовленный по [14]. Результаты по содержанию биохимических компонентов являются средними ($\bar{x}$) из 4 биологических повторностей. Их вариабельность характеризуется выборочным стандартным отклонением (s).

Результаты и обсуждение. Клетки микроводоросли *P. nanum* – округлые с двумя пристенными хлоропластами и углублением в верхней части клетки, средний размер клеток в культуре составлял: длина – $6 \pm 0,5$ мкм, ширина – $5,5 \pm 0,4$ мкм, объем клетки – $63 \pm 0,5$ мкм³.

При исследовании биохимического состава *P. nanum* было выявлено высокое содержание белков и углеводов – 41 и 25 % от сухой массы клеток соответственно (рис. 1). В составе суммарных углеводов 78 % приходилось на резервные углеводы, которые являются легко усвояемыми и служат источником энергии для метаболических процессов во время личиночного развития моллюсков [13]. Количество липидов в клетках микроводоросли было невысоким – 14 %, однако, как известно, в состав жирных кислот *P. nanum* входят полиненасыщенные кислоты – эйкозопентаеновая и докозагексаеновая, содержание которых достигает 17 % [3]. Эти кислоты являются важными компонентами в пищевом спектре культивируемых моллюсков, ракообразных, рыб, в особенности их личиночных стадий [3, 15, 16].

Пигментный состав *P. nanum* представлен хлорифиллами a, b, c1, c2 и каротиноидами. Каротиноидный состав пигментов не типичен для динофлагеллят. Нами выделено 5 фракций каротиноидов: β -каротин, фукоксантин и его производные, диадиноксантин, диадинохром (рис. 2). Доминирующими каротиноидами были диадиноксантин и фукоксантин – 41 и 36 % соответственно от суммы общих каротиноидов. Так, если диадиноксантин, диадинохром и β -каротин – пигменты, часто встречающиеся у динофлагеллят, то фукоксантин – основной каротиноид диатомовых и золотистых водорослей. Характерным же пигментом динофитовых водорослей является перидинин, обнаруженный в других видах рода *Prorocentrum* [17, 18].

В литературе есть данные о наличии фукоксантина в некоторых видах динофитовых, в т. ч. у *Prorocentrum*, но его вклад в суммарные каротиноиды минимален [18, 19]. Фотосинтетические динофлагелляты содержат несколько типов хлоропластов, одни из которых – фукоксантинсодержащие хлоропласты, произошедшие от гаптофито-

вых водорослей в результате третичного эндосимбиоза их общего предка. Эти пласти-
ды обычно содержат хлорофиллы с1, с2 и фукоксантин, но отсутствует перидинин [19].

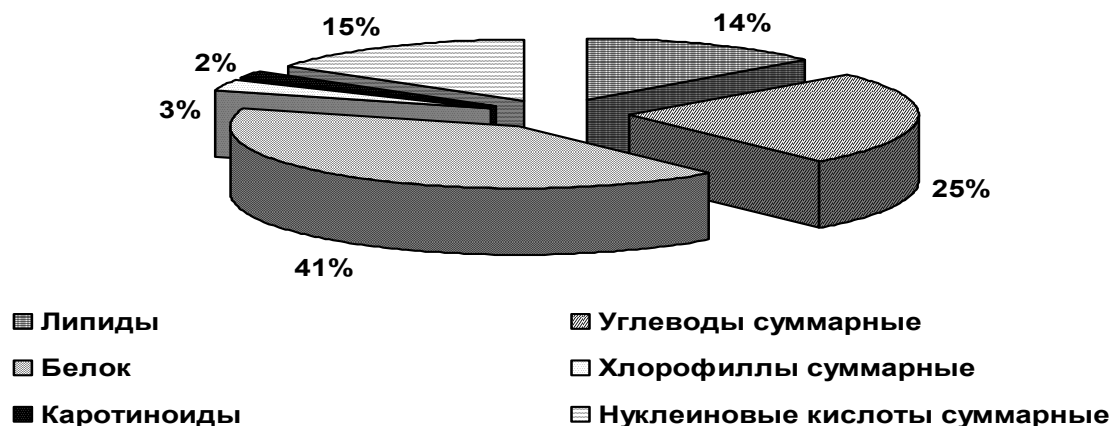


Рис. 1 Содержание биохимических компонентов в клетках *P. nanum*

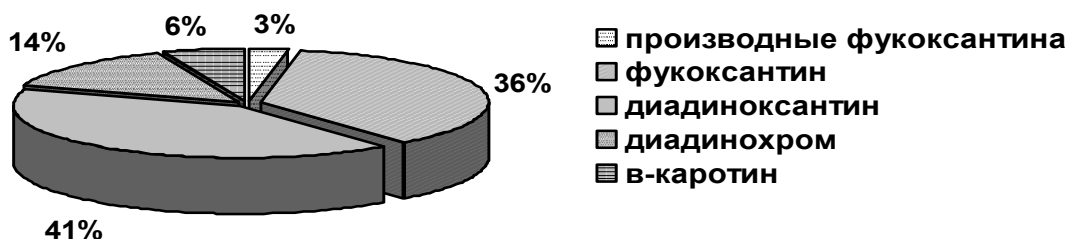


Рис. 2 Соотношение основных фракций каротиноидов *P. nanum*

Заключение. Содержание и соотношение основных биохимических компонентов клеток динофитовой водоросли *P. nanum* позволяет использовать ее как кормовой объект при культивировании морских беспозвоночных. Наличие фукоксантина как одного из доминирующих пигментов каротиноидного состава открывает возможность для дальнейшего исследования этой водоросли как источника биологически активных веществ, а также для филогенетического анализа динофитовых водорослей.

1. Трощенко О. А., Куфтаркова Е. А., Лисицкая Е. В. и др. Результаты комплексных экологических исследований на акватории мидийно-устричной фермы (Голубой залив, Крым, Чёрное море) // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2012. Т. 1, № 26. С. 291–309.
2. Марикультура мидий на Черном море / ред. В. Н. Иванов; НАН Украины, Ин-т биологии южных морей. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. 314 с.
3. Meyer B., Irigoien X., Graeve M., et all. Feeding rates and selectivity among nauplii, copepodites and adult females of *Calanus finmarchicus* and *Calanus helgolandicus* // Helgol. Mar. Res. 2002. 56. P. 169–176.
4. Mansurova I. M. Effect of light intensity on the content of chlorophyll *a*, carbon and nitrogen in six species of Dinophyta from the Black sea (Crimea) // International Journal on Algae. 2015. V. 17, Is. 4. P. 363–370.
5. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / ред. А. В. Топачевский. Киев : Наук. думка, 1975. 247 с.
6. Копытов Ю. П., Дивавин И. А., Цымбал И. М. Схема комплексного биохимического анализа гидробионтов // Рациональное использование ресурсов моря – важный вклад в реализа-

- цию продовольственной программы: мат-лы конф. Севастополь, 1985. Ч .2. С. 227–231. – Деп. В ВИНИТИ 16.04.85, № 2556–85.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Faar A. L. et al. Protein measurement with folin phenol reagent // Journ. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, № 1. P. 265–275.
 8. Большой практикум по физиологии растений / ред. Б.А. Рубин; М : Высш. Шк., 1975. 439 с.
 9. Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23, № 5. С. 656–662.
 10. Rowan K. S. Photosynthetic Pigments of Algae. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. 334 p.
 11. Руководство по современным биохимическим методам исследования водных экосистем, перспективных для промысла и марикультуры / ред. А. И. Агатова; ВНИРО, 2004. 123 с.
 12. Jeffrey S. W., Humphrey G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanz. 1975. 167. P. 191–194.
 13. Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Wright S. W. Phytoplankton pigments in oceanography. – UNESCO, 1997. 661 p.
 14. Ryabushko V. I., Prazukin A. V., Popova E. V., Nekhoroshev M. V. Fucoxanthin of the brown alga *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh from the Black Sea // J. Black Sea / Mediterranean Environment. 2014. Vol. 20, No. 2. 108–113.
 15. Langdon C. J., Waldock M. J. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat // Journal of the Marine Biological Association, United Kingdom. 1981. 61. P. 431–448.
 16. Sargent J. R., McEvoy L. A., Bell J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds // *Aquaculture*. 1997. 155. P. 117–127.
 17. Lawrence W. Harding Jr. The time-course of photoadaptation to low-light in *Prorocentrum mariae-lebouriae* (Dinophyceae) // Journal of Phycology. 2008. V. 24, Is. 2. P. 274–281.
 18. Berden-Zrimec M.; Flander-Putrlle V.; Drinovec L.; Zrimec A.; Monti M. Growth, delayed fluorescence and pigment composition of four *Prorocentrum minimum* strains growing at two salinities // Biol. Res. 2008. 41. P. 11–23.
 19. Yoon H. S., Hackett J. D., Bhattacharya D. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2002. 99. P. 11724–11729.

BIOCHEMICAL COMPOSITION IN DINOFLAGELLATE *PROROCENTRUM NANUM*

I. A. Kharchuk, N. V. Pospelova

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, Sevastopol, RF, seaferm@yandex.ru

Prorocentrum species are used as feed in aquaculture. Due to the fact that the nutritional value of microalgae in aquaculture is determined by content and ratio of biochemical components there were investigated content of proteins, carbohydrates, nucleic acids, and pigments of dinoflagellate *Prorocentrum nanum*. It was noted high content of proteins, reserve carbohydrates (in particular reserve ones). One of the dominant carotenoid pigment is fucoxanthin. The content and ratio of biochemical components of *P. nanum* allows us to use it as a food object for cultivated sea invertebrates.

Key words: *Prorocentrum nanum*, biochemical composition, carotenoids, fucoxanthin, biotechnology, aquaculture