

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт морских биологических исследований
имени А.О. Ковалевского Российской академии наук

на правах рукописи

Гуреева Елена Викторовна

**СОДЕРЖАНИЕ КАРОТИНОИДА ФУКОКСАНТИН
В БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЯХ *CYSTOSEIRA BARBATA* (STACKHOUSE)
S. AGARDH И *CYSTOSEIRA CRINITA* DUBY (ЧЁРНОЕ МОРЕ)**

03.02.10 – гидробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Рябушко Виталий Иванович

Севастополь - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Экологическая характеристика и запасы бурых водорослей рода <i>Cystoseira</i> в Чёрном море	12
1.2 Аккумуляция металлов бурыми водорослями и механизмы их накопления	17
1.3 Пигментный состав бурых водорослей	22
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	31
2.1 Характеристика районов исследования	31
2.2 Объекты исследования	34
2.3 Определение индивидуального возраста таллома и ветвей цистозире	35
2.4 Определение концентрации фукоксантина	37
2.4.1 Метод получения кристаллического фукоксантина и его физико- химические характеристики	38
2.5 Определение концентрации тяжёлых металлов в водорослях и грунте	44
2.6 Определение содержания общих липидов и метиловых эфиров жирных кислот	45
2.7 Статистический анализ экспериментальных данных	47
ГЛАВА 3 СОДЕРЖАНИЕ ФУКОКСАНТИНА В БУРЫХ ВОДОРОСЛЯХ ЧЁРНОГО МОРЯ	48
3.1 Концентрация фукоксантина в некоторых видах бурых водорослей	49
3.2 Содержание фукоксантина в разновозрастных ветвях <i>C. barbata</i> и <i>C. crinita</i>	50

3.3 Годовая динамика содержания фукоксантина в ветвях <i>C. barbata</i> и <i>C. crinita</i>	54
3.4 Концентрация фукоксантина в стволах цистозир	58
3.5 Зависимость содержания фукоксантина в бурых водорослях от уровня инсоляции	60
ГЛАВА 4 КОНЦЕНТРАЦИЯ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ В БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЯХ РОДА <i>CYSTOSEIRA</i> ИЗ АКВАТОРИЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ	75
4.1 Содержание тяжелых металлов в разновозрастных ветвях <i>Cystoseira barbata</i>	75
4.2 Годовая динамика содержания тяжёлых металлов в цистозирах	83
4.2.1 Сезонная динамика содержания тяжёлых металлов в стволах цистозир	86
4.3 Содержание тяжёлых металлов в <i>C. barbata</i> и <i>C. crinita</i> из акваторий с разным антропогенным уровнем	89
4.3.1 Концентрация меди и цинка в некоторых видах черноморских бурых водорослей	97
4.4 Содержание различных микроэлементов в ветвях <i>C. barbata</i>	97
ГЛАВА 5 АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ФУКОКСАНТИНА В БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЯХ РОДА <i>CYSTOSEIRA</i> ..	110
5.1 Методология обработки результатов измерений концентрации фукоксантина и тяжёлых металлов в макрофитах	111
5.1.1 Принцип нормализации экспериментальных данных	111
5.1.2 Процесс моделирования и нормализации результатов	112
5.2 Определение зависимости между содержанием фукоксантина и свинца в водорослях	116
5.3 Определение зависимости между содержанием фукоксантина и меди в водорослях	123

5.4 Определение зависимости между содержанием фукоксантина и цинка в водорослях	127
5.5 Взаимосвязь содержания фукоксантина, цинка и свинца в бурых водорослях рода <i>Cystoseira</i>	130
ГЛАВА 6 БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ РОДА <i>CYSTOSEIRA</i>	136
6.1 Концентрация липидов и фукоксантина в разновозрастных ветвях <i>C. barbata</i>	137
6.2 Состав жирных кислот ветвей <i>C. barbata</i>	139
6.3 Содержание жирных кислот в разновозрастных ветвях <i>C. barbata</i> и их связь с концентрацией фукоксантина	145
6.4 Получение профилактического продукта, содержащего фукоксантин, из бурых водорослей рода <i>Cystoseira</i>	147
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	152
ВЫВОДЫ	154
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	156

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

пгт – поселок городского типа;

Фк – фукоксантин;

сух. – сухая масса;

ТМ – тяжелые металлы;

SD – стандартное отклонение;

CO1 - цитохром С-оксидаза;

ROS - реакционноспособные виды кислорода;

DPPH -1,1-дифенил-2-пикрилгидразил радикал;

UCP1 - митохондриальный разобщающий белок 1;

КК-А^y– линии мышей с ожирением и сахарным диабетом;

ЛКП – лакокрасочное покрытие;

ЖК – жирные кислоты;

НЖК – насыщенные жирные кислоты;

МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты;

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты;

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот;

АК – арахидоновая кислота;

ЭПК – эйкозапентаеновая кислота;

БАВ – биологически активные вещества;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Фукоксантин (Фк) – каротиноид оранжевого цвета, вместе с хлорофиллами а, с и β -каротином содержится в бурых, диатомовых и золотистых водорослях [227]. Фк обладает выраженной фармакологической активностью, в частности проявляет антиоксидантное, цитостатическое, противовоспалительное, гипотензивное и антидиабетическое действие [214, 231]. Исследования показали, что содержание Фк варьирует в различных морских водорослях и является видоспецифичным [272]. Ранее этот пигмент был выделен и идентифицирован из бурых водорослей родов *Laminaria*, *Sargassum*, *Undaria*, произрастающих в основном в дальневосточном регионе [61, 111, 158]. Сырьём для получения Фк также могут стать черноморские бурые водоросли. В Чёрном море водоросли рода *Cystoseira* C. Agardh широко распространены вдоль побережья и являются одним из доминантов донных сообществ верхней сублиторали.

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), найденные в бурых водорослях, оказывают положительное влияние на здоровье человека [93, 115]. Главный ресурс получения n-3 ПНЖК – морская рыба, однако, учитывая сокращение запасов рыбного сырья, необходим поиск новых источников ПНЖК [226]. Существует много исследований по содержанию ЖК в бурых водорослях, в том числе цистозирах из разных мест обитания [116, 181, 266, 272, 282].

Бурые водоросли являются признанными биоиндикаторами загрязнения ксенобиотиками прибрежных морских акваторий. Сведений о содержании тяжёлых металлов в цистозирах существует довольно много, однако они зачастую приводятся без учёта индивидуальных морфологических особенностей макрофита. Сезонные изменения концентрации тяжёлых металлов в водорослях могут зависеть как от их количества, растворённого в воде, так и от особенностей вегетации растений в разное время года.

До настоящего времени сведения о динамике содержания Фк в бурых водорослях рода *Cystoseira* из Чёрного моря практически отсутствуют, поэтому исследования содержания фукоксантина, жирных кислот и некоторых тяжёлых

металлов, а также выявление возможной связи этих параметров в макрофитах из акваторий с разным уровнем антропогенной нагрузки, определяют актуальность выбранной темы.

Степень разработанности темы исследования. Данные по содержанию Фк в цистозирах Чёрного моря представлены только для *Cystoseira barbata* и были получены в середине прошлого столетия [59]. В этой работе приведены сведения о содержании суммы ксантофиллов (фукоксантин, виолаксантин и неофукоксантин-А), что осложняет проведение сравнительного анализа полученных значений с концентрациями пигментов у других бурых водорослей. Определение возраста ветвей проводилось без уточнения морфофизиологических особенностей цистозеры и представлено всего двумя группами; также в то время не было достоверных методов определения структуры полученных пигментов (ВЭЖХ, ЯМР и т.д.). Сведения о концентрациях химических элементов, в т.ч. тяжёлых металлов, в цистозирах из Чёрного моря приведены в многочисленных литературных источниках, однако сравнительные данные о содержании фукоксантина в макрофитах из районов с разным уровнем антропогенной нагрузки отсутствуют.

Цель работы – установить общие закономерности изменчивости содержания фукоксантина в двух видах бурых водорослей рода *Cystoseira*, обитающих в разных экологических условиях крымского побережья Чёрного моря.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать содержание фукоксантина в талломах некоторых видов бурых водорослей Чёрного моря.
2. Изучить годовой цикл изменения содержания фукоксантина в талломах двух видов рода *Cystoseira* – *C. barbata* (Stackhouse) C. Agardh 1820 и *C. crinita* Duby 1830.
3. Изучить концентрацию макро- и микроэлементов, в т.ч. тяжёлых металлов, в водорослях рода *Cystoseira* из районов с разным уровнем антропогенной нагрузки (акватория Фороса и Карантинная бухта).

4. Исследовать состав и содержание жирных кислот в разновозрастных ветвях *C. barbata* и их связь с концентрацией фукоксантина.
5. Разработать технологию получения профилактического продукта из бурых водорослей, содержащего фукоксантин.

Научная новизна. Впервые получена количественная оценка синхронных измерений концентрации фукоксантина, метиловых эфиров жирных кислот и 32 макро- и микроэлементов в ветвях *C. barbata* разного возраста. Максимальные концентрации Фк и большинства элементов обнаружены в ветвях макрофитов возрастом 2-3 месяца. Впервые представлены данные по сезонной динамике содержания Фк и некоторых тяжёлых металлов в разновозрастных ветвях и стволах бурых водорослей рода *Cystoseira* в акваториях Чёрного моря с разной антропогенной нагрузкой. Найдено, что содержание пигмента в ветвях *C. barbata* выше, чем в ветвях *C. crinita*, независимо от места отбора проб. Впервые определены концентрации Фк в других бурых водорослях: *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy, *Dictyota spiralis* Montagne, *Cladostephus spongiosus* (Hudson) C. Agardh и *Nizamuddinina zanardinii* (Schiffner) P.C. Silva.

Теоретическая и практическая значимость. Изучение сезонных изменений содержания фотосинтетических пигментов у макрофитов необходимо для выявления факторов, регулирующих продуктивность морских водорослёвых сообществ в течение их вегетационного цикла. Полученные экспериментальные данные о синхронных измерениях концентрации фукоксантина и некоторых тяжёлых металлов в бурых водорослях рода *Cystoseira* расширяют теоретические знания об особенностях антропогенного влияния на прибрежные морские экосистемы. Моделирование зависимости содержания фукоксантина у водорослей рода *Cystoseira* от интенсивности общего светового потока с помощью полиномиальной аппроксимации позволило установить, что данный процесс хорошо описывается биквадратным уравнением с высоким коэффициентом детерминации. Установлено, что для целей биомониторинга загрязнения окружающей среды тяжёлыми металлами и др. элементами предпочтительно использовать молодые ветви цистозир возрастом 2-3 мес., чем иные

морфоструктурные элементы макрофита. Разработана новая технология получения из бурых водорослей рода *Cystoseira* лечебно-профилактического продукта, содержащего до 5% фукоксантина. Для этих целей можно использовать как свежесобранные макрофиты, так и водоросли из штормовых выбросов. Показано, что *C. barbata* имеет оптимальное для здоровья человека соотношение n-3/n-6 ПНЖК, равное 1,0.

Методы исследования. Для определения концентрации фукоксантина в бурых водорослях использовали методы препаративной ТСХ и в соответствии с Патентом 86671 U UA; содержание макро- и микроэлементов определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой; концентрацию метиловых эфиров жирных кислот определяли методом газовой хроматографии. Статистический анализ экспериментальных данных выполнен в программах Microsoft Excel и Origin Pro; для целей моделирования использовали многослойную нейронную сеть [105].

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Содержание фукоксантина, макро- и микроэлементов, липидов и метиловых эфиров жирных кислот в цистозирах зависит от возраста ветвей растения.
2. Концентрация тяжёлых металлов в талломах бурых водорослей зависит от видовой принадлежности макрофитов, сезона года и загрязнения места обитания;
3. Для целей биомониторинга загрязнения окружающей среды макро- и микроэлементами, включая тяжёлые металлы, предпочтительнее использовать молодые ветви цистозир, чем другие морфоструктурные элементы макрофита.

Достоверность результатов обеспечена большим объёмом фактического материала (805 проб), собранного на 3 участках акватории Крымского побережья; многократностью повторения измерений и применением статистической обработки экспериментальных данных.

Личный вклад соискателя. В основу настоящей работы положены результаты экспериментальных исследований, проведённых автором в трёх

акваториях Крымского п-ова в течение 2013–2014 гг. и 2016–2018 гг. Автор принимал непосредственное участие в отборе проб, обработке материала, проведении анализов, самостоятельно интерпретировал и обобщал полученные данные. Также автор принимал участие в обсуждении результатов и написании текстов совместных статей с соавторами. Диссертационная работа написана лично соискателем.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были представлены: VIII международная научно-практическая конференция молодых учёных «Понт Эвксинский 2013» (Севастополь, 2013); Белорусско-Российская научно-практическая конференция с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013); Молодёжная научно-практическая конференция «Экологические проблемы Азово-Черноморского региона и комплексное управление прибрежной зоной» (Севастополь, 2014); II международная научно-практическая конференция «Народы Черноморско-Каспийского региона: проблемы и пути их решения» (Ростов-на-Дону, 2014); XXI российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2014) и Общеинститутский научный семинар ФГБУН «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН» (Севастополь, 2018).

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 187 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы, включающего 294 источника, из них 235 иностранных. Работа содержит 15 таблиц и 51 рисунок.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 7 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и ВАК Украины (вышедших из печати до января 2015 г.), в т.ч. 2 патентах. В статьях, опубликованных в соавторстве, вклад соискателя состоит в выборе и разработке методов исследования, получении экспериментальных данных, обсуждении и написании текста статей и тезисов. Права соавторов публикаций не нарушены.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю диссертационной работы, д.б.н. В.И. Рябушко за помощь при

постановке цели и задач исследования, обсуждении результатов, участие в написании совместных работ. Особую благодарность выражаю соавторам публикаций: к.б.н. М.В. Нехорошеву за практическую помощь в освоении методик определения фукоксантина, липидов и жирных кислот, а также м.н.с. Н.И. Бобко – за оказание помощи в определении содержания элементов в макрофитах, д.б.н. А.В. Празукину – за консультации и помощь в определении возраста цистозир, м.н.с. М.А. Гурееву (ПМГМУ им. И.М. Сеченова, Москва) – за ценные консультации при проведении математического анализа данных. Автор выражает благодарность Dr. Takashi Maoka (Research Institute for Production Development, Kyoto, Japan) за помощь в идентификации фукоксантина.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Экологическая характеристика и запасы бурых водорослей рода *Cystoseira* в Чёрном море

В течение длительного времени водоросли широко используют как источник промышленно важных полисахаридов, таких как агар, каррагинан, фукоидан и др. [163]. Биологически активные вещества (БАВ) из макрофитов применяют для приготовления фармацевтических, пищевых, косметических и сельскохозяйственных препаратов. Фукусовые водоросли являются ценным сырьем для получения моносахаридов (маннит), полисахаридов (альгинатов, фукоидана), липидов, в составе которых ценные полиненасыщенные жирные кислоты омега-3 и пигменты, фитогормоны. Также бурые водоросли имеют сбалансированный макро- и микроэлементный состав и содержат витамины в 100-1000 раз выше, чем наземные растения [32]. Развитие технологий получения БАВ позволило, особенно в последние годы, создать большой ассортимент лекарственных и лечебно-профилактических препаратов, включающих сами макрофиты и продукты их переработки. Среди них значительное место занимают препараты на основе бурых водорослей. Источником ценных БАВ также могут служить бурые водоросли рода *Cystoseira*.

В Чёрном море произрастают 2 массовых вида бурых водорослей: *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh и *Cystoseira crinita* Duby. Они относятся к порядку Fucales, семейству Sargassaceae. Средняя длина слоевищ цистозир составляет 60–70 см. В наибольшем количестве можно встретить талломы возрастом 8–10 лет, но водоросль может достигать возраст 15 и более лет. В прибрежной зоне Чёрного моря наибольшие скопления цистозир представлены, в основном, на твердых грунтах на глубинах 0,5–10 м. По биомассе и численности цистозира преобладает на глубинах до 5 м [7]. Наиболее широко представлена *C. crinita*, обитающая, главным образом, у открытых берегов с интенсивным движением воды. *C. barbata*

больше приурочена к закрытым бухтам, где интенсивность внешнего обмена значительно ниже [2].

C. crinita заселяет верхнюю часть сублиторали, где волнение воды значительно интенсивнее, лучше переносит эвтрофикацию водоема и в условиях бытового загрязнения вытесняет *C. barbata* на глубины свыше 3-5 м. Известно, что у таллома *C. crinita*, в отличие от *C. barbata*, тонкий ствол с гладкой поверхностью, что делает его более гибким и эластичным [18]. Вероятно, причиной обитания *C. crinita* в условиях высокой прибойности у незащищенных участков берега являются не морфологические отличия *C. crinita* от *C. barbata*, а более интенсивный метаболизм [3].

Бурые водоросли произрастают на глубинах менее 15-30 м. В эуфотической зоне свет не лимитирует их рост ввиду способности к световой адаптации [54, 120]. На рост таллома водоросли влияет интенсивность света, поэтому у черноморской цистозеры максимум роста приходится на летне-осенний период, когда освещенность и температура воды максимальны [42].

Талломы цистозеры состоят из разновозрастных элементов (Рисунок 1.1), имеющих разную функциональную нагрузку [48]. Внутривидовые различия более ярко выражены у *C. barbata*, чем у *C. crinita*, так как последняя распространена у открытых берегов, то есть обитает в более однородных условиях, чем *C. barbata* [18]. Кусты *C. barbata* одиночные, длиной 20-170 см и толщиной 4-12 мм. От ствола отходят боковые главные и адвентивные ветви, густо покрывающие поверхность ствола. На стволе отсутствует гладкая наружная оболочка. Ствол широкий с большим количеством адвентивных ветвей. Это делает слоевище грубым, менее гибким и стойким в условиях высокой прибойности. Данные особенности объясняют приуроченность *C. barbata* к защищенным участкам моря.

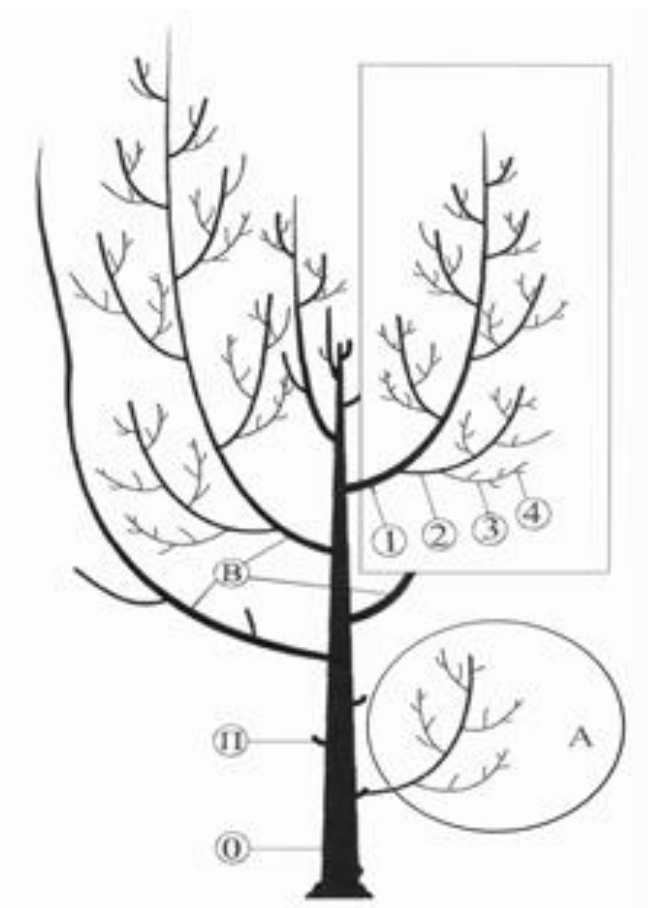


Рисунок 1.1 – Схема строения слоевища *Cystoseira barbata*: О – ствол (ось нулевого порядка); В – вершущечные ветви (основные); А – адвентивные ветви; П – пеньки. 1 – ось первого порядка; 2 – ось второго порядка; 3 – ось третьего порядка; 4 – ось четвёртого порядка

Размножение цистозир, как и всех фукусовых водорослей, происходит половым путем. Органы размножения – концептакулы, расположены в рецептакулах. Закладка концептакулов у черноморских цистозир начинается в конце января. В процессе их роста и развития кончики ветвей постепенно утолщаются, в результате чего образуются рецептакулы. Рецептакулы появляются на ветвях, имеющих боковые ветви 3-4 порядков. С периодом роста и развития рецептакулов совпадает окончание роста ветви. В этот период ветвь покрывается эпифитами. После полного высыпания половых клеток вначале разрушаются рецептакулы, а затем опадают боковые ветви. На растениях, обитающих в защищенных участках, зрелые ветви долгое время сохраняются на слоевище, поэтому половые клетки здесь достигают своего полного развития. Массовое опадание старых генеративных ветвей у черноморских цистозир наблюдается в июле-августе. У талломов возрастом 10 и более лет образуется меньше основных боковых ветвей и их размеры в 1,5-2 раза меньше, чем у молодых растений. У открытых берегов боковые ветви значительно короче, чем у растений,

произрастающих в защищенных участках берега. За весенний период на одном слоевище вырастает пять-семь боковых ветвей длиной от 60 до 450 мм [18].

Возраст боковых ветвей у цистозиры составляет 5-7 месяцев, ствол – многолетний. Среднегодовой прирост ствола у *C. crinita* – 28 мм, а у *C. barbata* – 24 мм. Активный рост цистозиры отмечен в весенний (апрель-июнь) и осенний (сентябрь - ноябрь) периоды. Рост цистозиры продолжается в течение всего года, в декабре и январе он замедляется. Наименьшая биомасса отмечена в летние и зимние месяцы, когда опадает большое число ветвей, выросших за весенний и осенний периоды [18].

У цистозиры разным морфологическим элементам таллома свойственна своя скорость роста. Самые молодые ветви в возрасте до 1 мес. отходят от апикальной точки. Ветви 2 и 3 порядков, возраст которых колеблется от 1 до 5 мес., относятся к более зрелым частям таллома. Они имеют насыщенный бурый окрас и наиболее активно фотосинтезируют. Ветви 6 мес. и старше занимают нижние ярусы и уже не растут [56]. Самые молодые ветви таллома (до 5 мм длиной) обычно растут очень медленно, затем с увеличением длины скорость роста возрастает и достигает максимальной у молодых ветвей длиной 20-30 мм. При высокой температуре воды в летний период скорость роста ветвей максимальна, затем она постепенно снижается [18].

Существуют разные методы определения возраста цистозиры. Один метод заключается в подсчете общего количества пеньков, оставшихся после обламывания ветвей, и главных боковых ветвей на стволе, поделенного на 11 [18]. Последнее число обозначает среднее количество ветвей, образующихся на стволах за год. На подсчете основных боковых ветвей основывается другой метод определения возраста цистозир [57]. Наблюдения показали, что прирост основных ветвей увеличивается до 5-6-летнего возраста, а затем прирост ветвей стабилизируется, и в течение года образуется, в среднем, 9,1 ветвей.

Наиболее удобный способ определения возраста черноморских цистозир основан на измерении длины ствола. Это один из наиболее стабильных возрастных признаков слоевища и практически не зависит от глубины произрастания

водоросли [35]. В результате многолетних наблюдений авторами была выведена следующая формула:

$$T = 0,132 + 0,35L_0 ,$$

где L_0 – длина ствола, см, T – возраст, лет.

В зависимости от возраста таллома наблюдается приуроченность обоих видов цистозир к разным глубинам [1, 3, 22]. Для районов с высокой антропогенной нагрузкой и интенсивным волнением наблюдается снижение среднего возраста растений по всем глубинам. При интенсивном движении воды влияние эвтрофикации и загрязнения на морфологию цистозир значительно выше, чем при слабом. Возрастной состав цистозир в чистых закрытых бухтах значительно превышает средний возраст растений открытых побережий.

Сырьевые запасы промысловых водорослей в Чёрном море достаточно велики, несмотря на высокую антропогенную нагрузку. На крымском и кавказском шельфе сосредоточены основные скопления макрофитов. На шельфе юго-западного и западного Крыма запасы цистозир наиболее велики и оцениваются в 34 тыс. тонн. Обширные заросли макрофитов сосредоточены в верхней и средней сублиторальной зоне, в нижней сублиторальной зоне у границы фитали количество водорослей меньше в 6–7 раз. Биомасса цистозир в верхней сублиторальной зоне варьирует от 25,2 до 74,4 т·га⁻¹, а в нижней – не превышает 0,03–5,0 т·га⁻¹ [49].

По утверждению ряда авторов, рациональное использование запасов цистозир без ущерба для популяций предусматривает изъятие не более 30–50 % биомассы с начала июня до наступления массового опадания боковых веточек, на которые приходится основная биомасса, преимущественно на глубине 0,5–20 м [7]. В возрасте 3 лет длина талломов достигает 0,5–0,6 м, биомасса – 4–6 кг·м⁻². С этого времени рекомендуется добыча цистозир. Щадящая добыча подразумевает срезание слоевища высотой 5–20 см от подошвы. Благодаря регенерирующей способности цистозир, сроки возобновления добычи на участке можно сократить вдвое и производить заготовку сырья 1 раз в 3 года.

Таким образом, бурые водоросли рода *Cystoseira* могут быть перспективным сырьем для получения биологически активных веществ. Также для этих целей

можно использовать штормовые выбросы водорослей, которые в основном состоят из цистозир, так как сбор сырья может сыграть ведущую роль в улучшении экологии и очистке прибрежной зоны. Однако некоторые ученые считают, что эксплуатация фиторесурсов Чёрного моря должна быть ограничена [47].

1.2 Аккумуляция металлов бурыми водорослями и механизмы их накопления

Накопление металлов водорослями обусловлено как естественным метаболизмом растений, так и чисто физическими процессами. Существует три основных механизма накопления тяжёлых металлов (ТМ): ионообменные реакции, хелатирование, реакции окисления-восстановления. При этом катионы металлов накапливаются по комбинированному пути с использованием нескольких путей биосорбции. Так, катионы свинца обладают наивысшим сродством к тканям водорослей в результате комбинирования всех три механизмов усваивания: ионообменные реакции, хелатирование, реакции окисления, сопровождаемые накоплением металлического свинца в матриксе клеточной стенки. В ходе ионообменной реакции ТМ замещает кальций, магний и катионы водорода в матриксе клеточной стенки. Большое влияние оказывают карбоксильные группы на биосорбцию металлов из-за наличия избыточных электронных плотностей на атомах кислорода и возможности образования донорно-акцепторной связи с катионом металла. Группы, содержащие атомы азота и серы (амины/амиды и сульфонаты/тиолы) также задействованы в процессы накопления ТМ и, в частности, свинца и кадмия [261].

В разной степени ионы ТМ могут оказывать влияние на процессы жизнедеятельности водорослей. Они могут вызвать как их гибель, так и неконтролируемое разрастание с последующим нарушением экосистемы. Помимо этого, накопление ТМ может вызвать мутации и их закрепление, что может привести к появлению видов водорослей, способных внести катастрофические изменения в биогеоценоз [239, 241]. Однако некоторые из элементов-загрязнителей

являются компонентами, необходимыми для нормальной жизнедеятельности водорослей и могут накапливаться в водорослях в период активного роста.

Медь в бурых водорослях играет роль катализатора дыхательной функции. Она является одним из важнейших компонентов дыхательной системы водорослей: цитохром С-оксидазы (CO1), осуществляющей восстановление кислорода до воды. Электроны, генерируемые в цитохроме-С, передаются через ион меди и гем А первой субъединицы на биметаллический центр, сформированный гемом А3 и ионом меди. В период активного роста интенсифицируется процесс дыхания и как следствие – накопление меди [209, 258]. Медь в морских водорослях входит в состав пластоцианина, белка, функционирующего в качестве агента переноса электронов между фотосистемой I и фотосистемой II [141]. Медь способна катализировать потенциально опасные реакции, также медь имеет высокое сродство к боковым цепям связывающих металл аминокислот, поэтому токсичность меди связана с неправильным включением металла в белки [9].

Средние значения концентрации меди в водорослях убывают в ряду: бурые > зелёные > красные [9]. Самый широкий диапазон варьирования меди у бурых водорослей (25 – 99 мкг·г⁻¹ и выше), среднее положение занимают зелёные водоросли (13,6 – 33 мкг·г⁻¹ и выше), а самый узкий диапазон – у красных водорослей (8 – 13 мкг·г⁻¹ и выше).

Цинк. Ионы цинка являются неотъемлемой частью белков, содержащих домен «цинковый палец» (zinc finger) – небольшой белковый домен, включающий один или два иона цинка, связанные координационными связями с аминокислотными остатками белка. Аминокислотная последовательность «цинкового пальца» варьирует в диапазоне 20 аминокислот. В образовании комплекса с ионом цинка участвуют по два гистидина и цистеина. Описанные белковые структуры являются модулями, взаимодействующими с ДНК, РНК и другими белками или малыми молекулами [103, 189]. Цинк превалирует в гидролитических ферментах, и, так как он не обладает окислительно-восстановительным потенциалом, обычно используется для стабилизации

белковых структур [9]. Цинк входит в состав фермента алкогольдегидрогеназы и других металлоферментов, необходимых для детоксикации ионов металлов [205].

Нехелатированные редокс-активные ионы металлов, такие как железо и медь, могут генерировать реакционноспособные виды кислорода (ROS) и приводить к окислительному стрессу. Несмотря на то, что цинк сравнительно менее опасен, наблюдаются признаки токсичности цинка, что может быть связано с неправильным включением цинка в белки или генерацией белковых агрегатов [206].

Среднее значение концентрации цинка у водорослей отдела Phaeophyta в 4,5 раза выше, чем у красных и зелёных водорослей. Соответственно, и диапазоны изменений концентрации цинка у бурых значительно шире ($359 - 1905 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$), чем у красных ($76 - 145 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$) или зелёных ($60 - 172 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$) водорослей [9].

Свинец токсичен для многих живых организмов. Он способен взаимодействовать напрямую с ДНК, РНК, индуцировать выделение активных форм кислорода, таких как супероксидный радикал и пероксид водорода, вызывающие оксидативный стресс и пероксидацию липидных мембран с повышением их проницаемости. Свинец, как и кадмий, угнетает процессы фотосинтеза за счёт изменения абсорбции катионов магния и железа, тем самым ингибируя процессы синтеза хлорофиллов [147, 261].

По убыванию средних значений концентрации свинца отделы талломных водорослей располагаются в ряд: бурые > зелёные > красные [9]. Диапазоны изменений концентрации свинца составляют у бурых водорослей $18,4 - 82 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ и выше, у зелёных – $13 - 52 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ и выше, у красных – $10,5 - 27 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ и выше.

Загрязнение ТМ прибрежной зоны моря представляет серьезную проблему, связанную с их токсичностью, разнообразием источников и накоплением в окружающей среде, поскольку они не являются биodeградируемыми [119]. Тяжелые металлы, находящиеся в высокой концентрации в водной среде, накапливаются в различных организмах, нанося ущерб их тканям и подавляя рост. Переходные металлы (медь, цинк, кадмий) изменяют метаболизм организмов путем стимулирования продуцирования реакционноспособных видов кислорода

(ROS) через реакцию Фентона и Габера-Вейса [149, 171]. В зависимости от вида макрофита, металлы проявляют токсичность в следующем порядке: $Zn < Pb < Ag < Cd < Cu < Hg$ [235]. Было установлено, что ТМ нарушают укладку белков, нарушают их нативные функции, что приводит к гибели организмов [148]. Они также вызывают образование активных форм кислорода, которые, в свою очередь, ухудшают функции белков, липидов и ДНК, вызывая окислительный стресс и, в конечном счете, клеточную смерть [175].

В прибрежье металлы находятся в растворенном состоянии, либо осаждаются на придонном слое, что зависит от таких физико-химических факторов, как pH, проводимость, соленость и т.д. [146, 197]. Тем не менее, анализ общего содержания металлов в воде и донных отложениях не предсказывает токсичность примесей по отношению к биоте [69, 236]. Поэтому водные организмы часто используют как объекты мониторинга загрязнения окружающей среды [280].

Даже при низких, следовых, концентрациях ТМ в воде, макрофиты способны их аккумулировать, достигая значений, в тысячи раз превосходящих соответствующие концентрации в морской воде [89]. Макроводоросли являются признанным биоиндикатором загрязнения морской воды ТМ благодаря их значительной биомассе, легкой идентификации и прикрепленному образу жизни [99, 191, 192]. Ochrophyta (бурые водоросли) и Chlorophyta (зеленые водоросли) наиболее часто используют в качестве биоиндикаторов, поскольку они проявляют явную тенденцию к накоплению ТМ [99, 173]. Исследования в области биосорбции проводят, в основном, на бурых водорослях [160, 194, 294], в меньшей степени на зеленых [65] и красных [161].

Клеточные стенки бурых водорослей обычно содержат три компонента: целлюлозу, альгиновую кислоту и сульфатированные полисахариды. Альгинат, внешний компонент клеточной стенки водорослей, отвечает за высокое содержание ТМ в бурых водорослях по сравнению с другими макрофитами, бактериями и грибами. Альгинат представляет собой линейный неразветвленный полисахарид, состоящий из чередующихся блоков D-маннуроновой и L-гулууроновой кислот. Как следствие, они богаты карбоксильными и сульфатными

группами, основными функциональными группами, участвующими в биосорбции ТМ [77, 80]. Ввиду большого содержания альгиновой кислоты, бурые водоросли предпочтительны в целях мониторинга загрязнений ТМ, так как обладают большей устойчивостью к ним по сравнению с красными и зелеными водорослями [8, 133].

Механизмы накопления металлов водными растениями. Металлы входят в контакт с поверхностью растений из воды или грунта, далее их проникновение в ткань происходит в ионной форме через 2 стадии: 1 – сорбция на поверхности, 2 – поглощение и последующая фиксация в тканях [39]. В результате реадсорбции металлы могут проникать в ткани или возвращаться в водную среду [9]. Процессы накопления элементов растениями зависят от освещенности [5, 40], различаются в живых и мертвых тканях макрофитов [10, 91], имеют ритмический характер, регулируемый работой энергетических систем растения [44].

Таким образом, ввиду большого содержания альгиновой кислоты, бурые водоросли предпочтительны в целях мониторинга загрязнений ТМ, так как обладают большой к ним устойчивостью. В литературе представлено большое количество работ, посвященных изучению содержания различных элементов, в том числе тяжелых металлов, в цистозирах из Черного моря [8, 23, 34, 41, 51, 52, 55, 192, 277, 274].

По-прежнему остается актуальным вопрос о биологической значимости макро- и микроэлементов для макрофитов, а также возможности применения отдельных, легко возобновляемых морфоструктурных элементов водорослей для исследования экологического состояния морской среды.

1.3 Пигментный состав бурых водорослей

Характерный пигментный состав бурых водорослей включает хлорофиллы а, с₁ и с₂, а также основные вспомогательные пигменты: β-каротин, фукоксантин, зеаксантин и виолаксантин [153]. Фукоксантин (Фк) – доминирующий каротиноид в бурых водорослях, является наиболее распространенным среди морских вспомогательных пигментов, его количество оценивается в более чем 10 % от общего количества всех каротиноидов природного происхождения [22, 215, 272].

Большинство каротиноидов – окрашенные пигменты, отражающие жёлтый, оранжевый и красный свет, являются основными цветными соединениями многих растений, водорослей и бактерий. В отличие от растений, животные не могут синтезировать каротиноиды и должны получать их из пищи с последующей конвертацией в функциональные метаболиты [132], известен лишь геном тли, единственная животная структура, способная кодировать ферменты для биосинтеза каротиноидов [220].

В морских водорослях каротиноиды синтезируются и накапливаются в пластидах, тогда как вторичные ксантофиллы (например, астаксантин в *Haematococcus pluvialis*) аккумулируются в цитоплазме. Тем не менее, эти ксантофиллы синтезируются в хлоропластах, но накапливаются в цитоплазме. Т.о. ксантофиллы могут быть найдены во всех клеточных компартментах [79, 126]. Все каротиноиды в хлорофиллах локализуются в пластоглобулах или тилакоидных мембранах, и, в зависимости от химической структуры молекулы каротиноида, оказывают значительное влияние на структурные и динамические свойства мембран [25, 142]. Помимо окрашивания, каротиноиды имеют широкий спектр функций: фотосинтез, антиоксидантные свойства, фототропизм и др.

Фотосинтез. Для осуществления фотосинтеза каротиноиды связываются с пептидами, образуя пигмент-белковые комплексы в тилакоидной мембране. В данном случае каротиноид выступает в качестве вспомогательного фотосинтетического пигмента, поглощающего кванты света в коротковолновой области спектра, с последующим трансфером возбуждённых электронов на

хлорофилл. Для разных каротиноидов эффективность передачи энергии колеблется от 30 до 90 %. В отдельных случаях каротиноиды являются светофильтрами, защищающими растения от яркого света. Например, в сине-зелёных водорослях они находятся в цитоплазматической мембране для защиты от яркого света [104].

Защита от свободных радикалов и фотодинамического эффекта. Каротиноиды во многих случаях одновременно с фотосинтезом выполняют функцию фотопротекторов, снижая окисляемость биологически важных молекул под влиянием видимого света в присутствии молекулярного кислорода и фотосенсибилизаторов. Каротиноиды обладают высокой противорадикальной активностью, обусловленную наличием сопряжённых двойных связей, которые придают им не только высокую лабильность, но и лёгкую окисляемость этих соединений с образованием эпоксидов с малой реакционной способностью. В ряде случаев возможна регенерация исходных ксантофиллов с полным восстановлением их функции [75, 281]. В отдельных организмах каротиноиды могут выступать как стабилизаторы мембран, защищая их от цепного окисления, а транспортные белки - от воздействия синглетного кислорода, благодаря способности образовывать малореакционноспособные пероксиды [14].

Фитогормональные функции. В водорослях каротиноиды возможно также играют роль в фототропизме и фототаксисе [87]. Каротиноиды являются предшественниками гормона растений - абсцизовой кислоты [254], которая, как известно, играет важную роль в выживании растения в условиях абиотического стресса, например высыхания или низкой температуры [216]. Кроме того, некоторые микроводоросли в условиях биотического или абиотического стресса, такого как воздействие света, температуры или высоких концентраций солей, способны производить активные вторичные метаболиты каротиноидов через процесс каротиногенеза, чтобы защитить себя. Тем не менее, существует очень мало информации о пути каротиногенеза в водорослях, так как гены и ферменты, используемые при этом, пока не известны [267].

Каротиноиды водорослей можно использовать как основу для таксономической классификации на зелёные, красные и бурые водоросли [267].

Например, красные водоросли содержат в основном зеаксантин и лютеин [98], в то время как фукоксантин является доминирующим ксантофиллом в бурых водорослях [81, 110].

Каротиноиды также проявляют ряд биологических активностей, включая противовоспалительные, противоопухолевые, антиоксидантные, противораковые и кардиопротекторные свойства [102, 212]. Несмотря на то, что проведено много исследований по растительным источникам каротиноидов, морские каротиноиды и их биофункции исследованы только в последние десятилетия [102, 167, 172]. Источники, богатые каротиноидами, используют в аквакультуре, а также для производства биологически активных добавок, например, на основе фукоксантина [60, 246].

Фукоксантин (Фк) – пигмент оранжевого цвета, вместе с хлорофиллами а, с и β -каротином содержится в бурых, диатомовых и золотистых водорослях [227]. Фк впервые выделили в 1914 г из бурых водорослей *Fucus*, *Dictyota* и *Laminaria* [288]. Структурная формула пигмента (Рисунок 1.2) определена Боннеттом [85, 86].

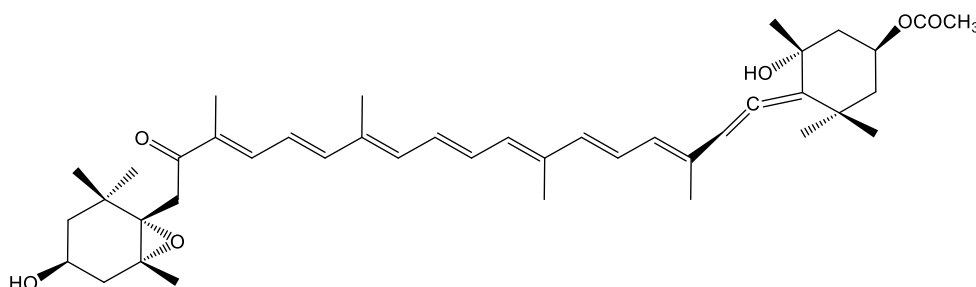


Рисунок 1.2 – Структура молекулы фукоксантина [85, 86]

Фк, связанный с несколькими белками и хлорофиллом а, образует фукоксантин-хлорофилл а-белковые комплексы в тилакоидах, где он действует как светоулавитель и переносчик энергии [187]. Фк обладает высокой биологической активностью, основанной на его уникальной молекулярной структуре, подобной неоксантину, диноксантину и перидинину. Молекула Фк имеет алленовую связь, эпоксидную и сопряженную карбонильную группы в полиеновой цепи (Рисунок

1.2), что отличает его структуру от растительных каротиноидов, таких как β -каротин и лютеин [227, 292]. Фк был первым алленовым каротиноидом, найденным в бурых водорослях [115]. Именно алленовая связь обеспечивает молекуле Фк высокую антиоксидантную активность [245]. Двойная связь в полиеновой цепи каротиноида позволяет ему существовать в двух конфигурациях: транс- и цис-, которые описывают расположение групп заместителей. Транс-фукоксантин ($\approx 88\%$) – основной изомер Фк, обнаруженный в *U. pinnatifida* [162] и большинстве растительных источников, за которым следует смесь 13-цис- и 13'-цис-изомеров ($\approx 9\%$) и 9'-цис-изомер [223].

Транс-форма Фк термодинамически более стабильна, чем его цис-аналог, из-за диполей заместителя с обеих сторон, что снижает стерическое препятствие. В работе [223] сообщили, что транс-форма Фк быстрее поглощается и включается в клеточные липиды, чем его цис-аналог. Обнаружено, что цис-изомеры оказывают более сильное ингибирующее действие на клетки лейкемии человека (HL-60) по сравнению с транс-аналогами. Фк также существует в другой форме - фукоксантинола, который содержится в клетках кишечника человека и мышцах после потребления Фк [201, 215]. Это показывает, что фукоксантинол является активной формой Фк в биологических системах.

Фк, идентифицированный в высушенных водорослях, хранящихся при температуре окружающей среды, присутствует в более низких концентрациях, что указывает на то, что процесс сушки может разложить пигмент [215]. Содержание Фк в значительной степени зависит от сезона года и жизненного цикла водорослей, достигая максимума между зимой и весной (зрелая фаза спорофита) и самой низкой в течение лета (фаза старения) [272].

Относительно пути биосинтеза Фк существует большое количество конкурирующих гипотез. Однако, когда были опубликованы данные последовательности генома для бурых водорослей, таких как *Ectocarpus siliculosus* [103], и диатомовых *Thalassiosira pseudonana* и *Phaeodactylum tricornutum* [71, 110], содержащих Фк, стало возможным сравнить каротиногенные гены этих водорослей с подобными в красных и зелёных водорослях, а также в наземных растениях.

Исходя из имеющейся на данный момент информации генома, можно предположить гипотетический путь биосинтеза Фк в бурых водорослях (Рисунок 1.3) [214].

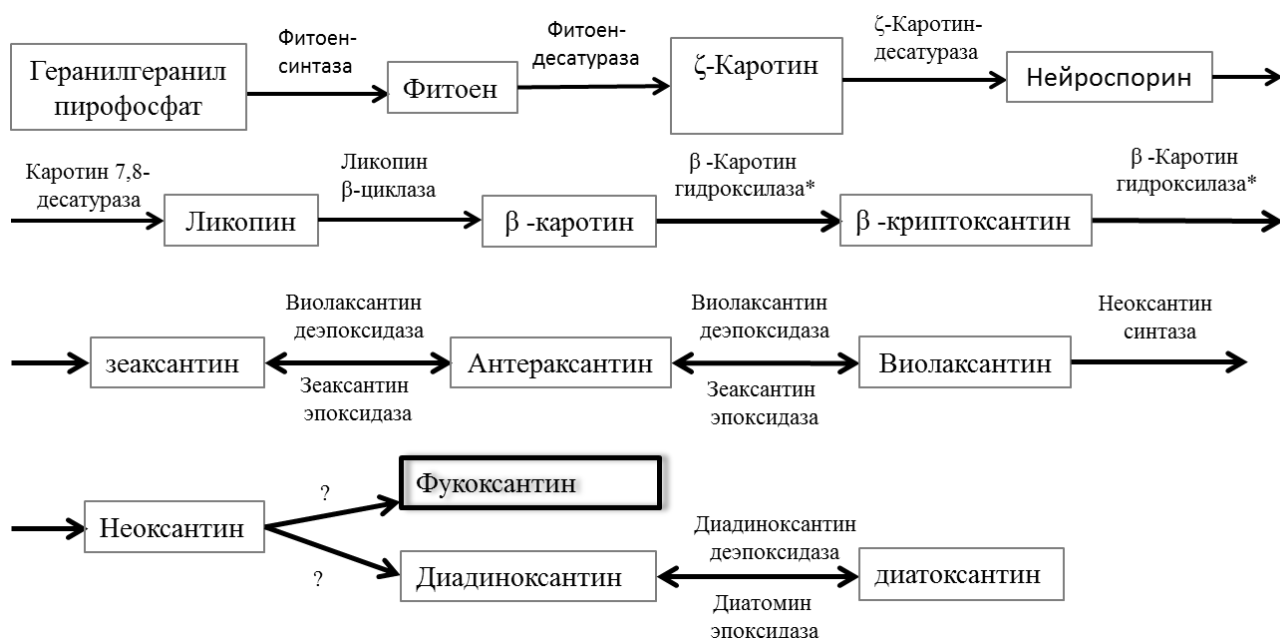


Рисунок 1.3 – Предполагаемый путь биосинтеза каротиноидов в бурых водорослях.

* - фермент, ещё не обнаруженный в водорослях [214]

Фармакологические свойства фукоксантина. Каротиноиды имеют много физиологических и биологических функций, включая их антиоксидантные свойства, а именно способность улавливать синглетный кислород и другие радикалы, предотвращая различные заболевания [66, 263]. Благодаря своим сильным антиоксидативным свойствам, Фк проявляет высокую терапевтическую активность, включая противораковый, гипотензивный, противовоспалительный и другие эффекты [117, 157, 211, 223, 249]. Также он применяется в терапии ожирения и сахарного диабета [198, 201, 202]. Фк замедляет активацию гиалуронидазы, понижая её концентрацию от 30 до 1 мкг·мл⁻¹, ингибируя расщепление гиалуроновой кислоты и коллагена, что находит применение в косметологии [158, 278]. Также Фк значительно ингибирует активность эластазы и ускоряет процесс удаления пигментных пятен [278].

В исследованиях *in vitro* [245] показана антиоксидантная активность Фк и его метаболита, фукоксантинола, путем улавливания свободных радикалов и синглетного кислорода [292]. Фк работает как антиоксидант в бескислородных условиях, в то время как другие каротиноиды, такие как β -каротин и лютеин, показали слабую или отсутствие активности в подобных условиях [227].

Терапия ожирения и диабета. В последние годы резко возрос процент людей с ожирением, которые попадают в группу риска заболевания диабетом второго типа, гиперлипидемией и артериальной гипертензией [136]. Данная группа заболеваний классифицируется как метаболический синдром, лечение которого всё более актуально в наши дни. При ожирении происходит нарушение регуляции производства адипоцитокинов в белой жировой ткани, что вызывает резистентность к инсулину и провоцирует развитие диабета второго типа [165, 207].

Терапевтический эффект обусловлен тем, что Фк промотирует образование митохондриального разобщающего белка 1 (UCP1) в белой жировой ткани у мышей с ожирением [203]. Содержание UCP1 обычно характерно для бурой жировой ткани, он способствует расходу энергии, запасённой в жировой ткани, на термогенез. В белой жировой ткани он, как правило, находится в низких концентрациях [97]. Обнаружено, что помимо классических бурых адипоцитов, присутствующих в бурой жировой ткани, найдены промежуточные между белыми и бурыми формами – так называемые бежевые адипоциты, экспрессирующие UCP1 в депо белой жировой ткани при воздействии холодом или β -адренергической стимуляции [247]. Эти адипоциты могут быть включены в процессы митохондриального дыхания и расхода энергии аналогично бурым жировым клеткам [247, 291]. Таким образом, эффект снижения веса при употреблении Фк может быть связан с превращением белых жировых клеток в бурые путём регулирования UCP1, что приводит к увеличению расхода энергии в организме.

Кроме того, Фк проявляет антидиабетическую активность у мышей линии КК-А^y с диабетом/ожирением [201] и у нормальных мышей, которых кормили пищей с высоким содержанием жиров [289]. Уровень глюкозы в крови был

значительно ниже при активации транспортера глюкозы 4 (GLUT 4) благодаря снижению резистентности к инсулину в скелетных мышцах мышей линии КК-А^у [225]. В белой жировой ткани мышей линии КК-А^у, потребляющих Фк, уровни экспрессии мРНК провоспалительных адипоцитокинов, таких как интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α , которые, как считается, вызывают резистентность к инсулину, заметно снижены [165]. Таким образом, вероятный механизм антидиабетической активности Фк может быть частично связан с улучшением чувствительности к инсулину путем подавления провоспалительных адипоцитокинов.

Противоопухолевые свойства. Неспособность химиотерапии, в частности, снизить показатели смертности при карциноме лёгких, толстой кишки, молочной и предстательной желёз свидетельствует о необходимости разработки новых подходов к профилактике рака и контролю его развития [262]. Один из перспективных методов хемо-превенции – нутрицевтический и фармакологический подход для снижения и предотвращения прогрессирования канцерогенных процессов при высоком уровне прогноза онкозаболевания. Ряд природных соединений, в частности антиоксидантных, включая каротиноиды, показали хемо-превентивную активность [196]. Фк ингибирует пролиферацию клеток гепатомы НерG2 [111] и клеток рака толстой кишки Сасо-2, НТ-29 в *in vitro* исследованиях [164]. Индукция апоптоза и супрессия циклина D - предполагаемые механизмы наблюдаемого антипролиферативного эффекта Фк. Противораковая активность Фк выше, чем у β -каротина. Кроме того, фукоксантинол, метаболит Фк [72], проявляет ещё более высокую апоптоз-индуцирующую активность на раковых клетках толстой кишки Сасо-2 и молочной железы MCF-7 по сравнению с Фк [190]. Эти результаты показывают, что Фк в организме преобразуется в другой каротиноид, фукоксантинол, который обладает высоким потенциалом в качестве противоракового средства.

В исследованиях *in vivo* найдено, что Фк ингибирует канцерогенез толстой кишки мышей, индуцированный 1,2-диметилгидразином [184]. Кроме того, Фк подавляет карценогенез двенадцатиперстной кишки и кожи, а также образование

опухоли печени у мышей. Эти эффекты, как полагают, происходят по механизму индукции апоптоза [286], остановки клеточного цикла [200] и антиоксидантной активности [199]. Т.о. воздействие Фк на опухолевые клетки имеет сложный многоступенчатый процесс, сопровождаемый взаимными синергическими эффектами угнетения роста клеток. Данные факты затрудняют точное определение молекулярного механизма действия Фк на опухолевые клетки.

Количественная оценка содержания Фк в некоторых видах бурых водорослей приведена в Таблице 1.1.

Таблица 1.1 – Концентрация фукоксантина в бурых водорослях

Вид	Содержание фукоксантина, мг·г ⁻¹	Масса	Источник литературы
<i>Petalonia binghamiae</i>	0,43-0,58	сырая	[221]
<i>Laminaria religiosa</i>	0,24	сырая	[221]
<i>Undaria pinnatifida</i>	0,32	сырая	[221]
<i>Undaria pinnatifida</i>	0,87	сухая	[185]
<i>Laminaria japonica</i>	0,12	сырая	[287]
<i>Laminaria japonica</i>	0,19	сырая	[174]
<i>Sargassum fulvellum</i>	0,06	сырая	[174]
<i>Hizikia fusiformis</i>	0,02	сырая	[174]
<i>Cystoseira hakodatensis</i>	1,9	сухая	[272]
<i>Sargassum confusum</i>	1,7	сухая	[272]
<i>Laminaria digitata</i>	0,468	сухая	[162]
<i>Laminaria japonica</i>	0,178-0,213	сухая	[162]
<i>Fucus serratus</i>	0,495-0,720	сухая	[162]
<i>Sargassum horneri</i>	2,12	сухая	[266]
<i>Cystoseira hakodatensis</i>	2,01	сухая	[266]
<i>Sphaerotrichia divaricata</i>	0,1-0,48	сухая	[203]

Европейское агентство по безопасности продуктов питания признало Фк безопасным. Фк рекомендован в Японии для применения в целях здравоохранения и Управлением контроля за продуктами и лекарствами США в качестве функционального ингредиента в пищевых продуктах и добавках. Мировое

производство Фк в 2015 г. составило примерно 500 т, и ожидается, что его производство увеличится на 5,3 % в период между 2016-2021 гг. [214]. Таким образом, поиск новых источников Фк, а также методов его выделения, остаётся актуальным. В настоящее время наиболее изученными источниками Фк являются бурые водоросли *Undaria pinnatifida*, *Hijikia fusiformis* и *Saccharina japonica*. Сырьё, из которого выделяют Фк, в основном добывают в акваториях Японского моря, Тихого (Гавайский архипелаг) и Индийского океанов.

Таким образом, анализ публикаций по изучению содержания источников Фк в различных видах бурых водорослей показал, что данные по концентрации пигмента в цистозирах из Крымского побережья Чёрного моря практически отсутствуют. Данные по распределению пигмента в разновозрастных морфоструктурных элементах цистозир также не представлены. Исследования по годовой динамике содержания Фк в цистозирах представлены только для *S. barbata* и выполнены в середине прошлого столетия [59]. Однако в то время не было достоверных методов определения структуры полученных пигментов (ВЭЖХ, ЯМР и т.д.). Ранее были опубликован ряд данных по концентрации тяжелых металлов в цистозирах, но они сильно различаются в зависимости от мест сбора проб и методик исследования. Также отсутствует сравнительная характеристика содержания важных микроэлементов и пигментов в водорослях.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика районов исследования

Исследование концентрации фукоксантина и тяжёлых металлов в бурых водорослях рода *Cystoseira* sp. выполнено на двух участках Крымского побережья Чёрного моря с различным уровнем загрязнённости морской среды (Рисунок 2.1): условно чистой акватории (пгт Форос, южный берег Крыма, станция 2: 44.39° N, 33.79° E) и более загрязнённой Карантинной бухте г. Севастополя (станция 1: 44.61° N, 33.49° E). Пробы других бурых водорослей были взяты в открытом море недалеко от Балаклавской бухты (станция 3: 44.49° N, 33.59° E).



Рисунок 2.1 – Карта-схема станций отбора проб водорослей в Чёрном море. Станции: 1 – Карантинная бухта, 2 – пгт Форос, 3 – Балаклавская бухта

В связи с тем, что водоросли отбирали из донных биоценозов Чёрного моря в отдалённых друг от друга районах исследования, расположенных в разных регионах крымского побережья, остановимся на краткой гидролого-

гидрохимической характеристике мест отбора проб. К основным источникам загрязнения, способным оказывать влияние на гидрохимический режим Севастопольского взморья, можно отнести городские промышленные, хозяйственно-бытовые, ливневые и речные стоки.

Карантинная бухта относится к загрязненным бухтам, поскольку в её акваторию происходят эпизодические аварийные сбросы хозяйственно-бытовых вод с действующих очистных сооружений (2 источника). В период их работы в море ежесуточно поступает до 3 тыс. куб. м неочищенных сточных вод, с высоким содержанием органических и минеральных форм азота и фосфора, повышенными значениями БПК₅ и окисляемости, низкой величиной pH. Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на экологическое состояние прибрежных морских вод, является ливневый сток. Во время ливней происходит повышение концентраций NO₂, NO₃, NH₄ и PO₄ в поверхностном слое Карантинной бухты, в которую поступают сточные воды ливневой канализации [16, 33]. В кутовой части бухты расположена база военных катеров и яхт-клуб, отрицательно влияющие на экологическое состояние вод. Учитывая преобладающие в прилегающей к бухте акватории юго-западные прибрежные течения, Карантинная бухта может являться источником загрязнения других бухт: Стрелецкой, Круглой, Камышовой и даже наиболее удаленной Казачьей бухты [24].

Акватория пгт Форос характеризуется более низким уровнем загрязнённости бытовыми и промышленными стоками. Данный факт обусловлен несколькими условиями:

- Отсутствие крупных производственных предприятий;
- Отсутствие военных, промышленных и гражданских портов;
- Низкая плотность заселения прибрежной зоны;
- Высокий охранный статус территорий, ввиду их принадлежности к санаторно-курортной зоне южного берега Крыма.

Также дополнительным фактором, влияющим на уровень загрязнённости вод, является профиль морского дна: шельф южного берега Крыма характеризуется резким свалом глубин и специфическим гидрологическим режимом [6].

Обратившись к карте течений Чёрного моря [21], отметим, что в отличие от Карантинной бухты, скорость течения в акватории пгт Форос значительно выше: 5-10 см/сек в Карантинной бухте и свыше 40 см/сек в зоне пгт Форос (Рисунок 2.2). Высокая скорость течения в местах отбора проб препятствует накоплению загрязнителей разного рода, тем самым обеспечивая низкий уровень антропогенной нагрузки. В связи с этим, для таких зон общей характерной чертой является малая загрязнённость морской среды. Для акватории Фороса характерны сезонные изменения течений и шторма, что может существенно сказываться на гидрохимической ситуации.

Станция 3, расположенная в открытом море недалеко от Балаклавской бухты, характеризуется высокой скоростью течения воды и отсутствием накопления загрязнителей из-за низкого уровня антропогенной нагрузки.



Рисунок 2.2 – Скорость поверхностных течений Чёрного моря у п-ва Крым [21].

1 - Карантинная бухта, 2 – пгт Форос, 3 – Балаклавская бухта

В отдельные сезоны года концентрация металлов в среде может значительно повышаться в связи с усилением терригенного стока в периоды обильных осадков [4], а также весной при снеготаянии, когда в водоёмы в больших количествах

поступают металлы, попавшие в снежный покров из атмосферы и накопившиеся в нём [17].

2.2 Объекты исследования

Материалом для исследования содержания фукоксантина и тяжелых металлов в бурой водоросли *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh 1820 и *Cystoseira crinita* Duby 1830 послужили пробы, собранные на каменистых субстратах крымского побережья Чёрного моря в период с октября 2013 г. по декабрь 2014 г., в июне-июле 2017 г. и июне 2018 г. Кроме этого, в августе 2016 г. были собраны бурые водоросли *Dictyota spiralis* Montagne 1846, *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivyin W.R.Taylor 1960 и *Cladostephus spongiosum* (Hudson) C. Agardh 1817.

Образцы водорослей рода *Cystoseira* использовали для анализа содержания фукоксантина и тяжёлых металлов в зависимости от возраста таллома и ветвей цистозир. Станции отбора проб цистозир находились в Карантинной бухте и в побережье пгт Форос на южном берегу Крыма на глубине 0,5 – 1 м. Другие 3 вида бурых водорослей отбирали в открытой части моря недалеко от Балаклавской бухты.

Всего было обработано 805 талломов цистозир (Таблица 2.1), из них 320 талломов *C. barbata*, 440 талломов *C. crinita*, 45 талломов других видов бурых водорослей.

Таблица 2.1 – Объём материала для исследования содержания фукоксантина и тяжёлых металлов в бурых водорослях

Место отбора проб	Количество	
	образцов водорослей	измерений
Карантинная бухта	460	670
Акватория пгт Форос	300	515
Балаклавская бухта	45	25
Итого:	805	1210

2.3 Определение индивидуального возраста таллома и ветвей цистозир

Свежесобранные талломы *C. barbata* и *C. crinita* разделяли на ствол и ветви. Структура таллома бурых водорослей рода *Cystoseira* представлена на Рисунке 2.3.

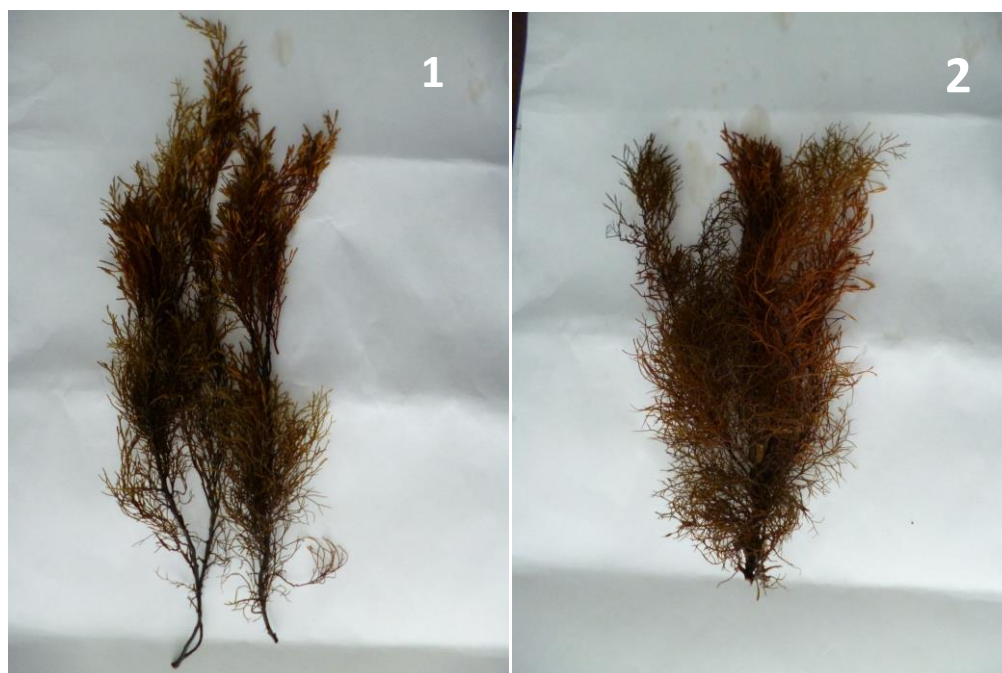


Рисунок 2.3 – Бурые водоросли рода *Cystoseira*. 1 – *C. crinita*; 2 – *C. barbata*

Возраст ветвей определяли по феноменологическим признакам состояния ветвей I порядка, в соответствии с методикой, описанной А.В. Празукиным [45]. В самом общем виде рост характеризуется изменением массы организма, дифференцировке и изменению формы его тела. С помощью этого подхода возможно описание роста ветви с использованием следующих данных: изменение индивидуальных параметров элементарных структур ветви с её ростом; изменение количества элементарных структур каждого класса, их общей массы и площади поверхности с ростом ветви; изменение соотношений осевых структур и рецептакулов с ростом ветви. Одновременное использование большого количества морфологических и морфофункциональных данных о структуре ветви и об изменении их в онтогенезе растения позволяет провести периодизацию онтогенеза

ветви. В результате было выделено 5 возрастных групп ветвей: до 1,9 мес.; от 2 до 3 мес.; от 3 до 5 мес.; от 5 до 6 мес.; более 6 мес. (Рисунок 2.4).

Возраст таллома (ствола) определяли по методике, описанной В.П. Парчевским [35], которая основана на определении возраста слоевища по длине ствола:

$$T = 0,132 + 0,35 L_0 ,$$

где T – возраст, лет; L_0 – длина ствола, см.

Это уравнение было получено при обработке больших выборок, собранных с разной глубины. Установлено, что величина L_0 является одним из наиболее стабильных признаков слоевищ и практически не зависит от глубины обитания макрофита.

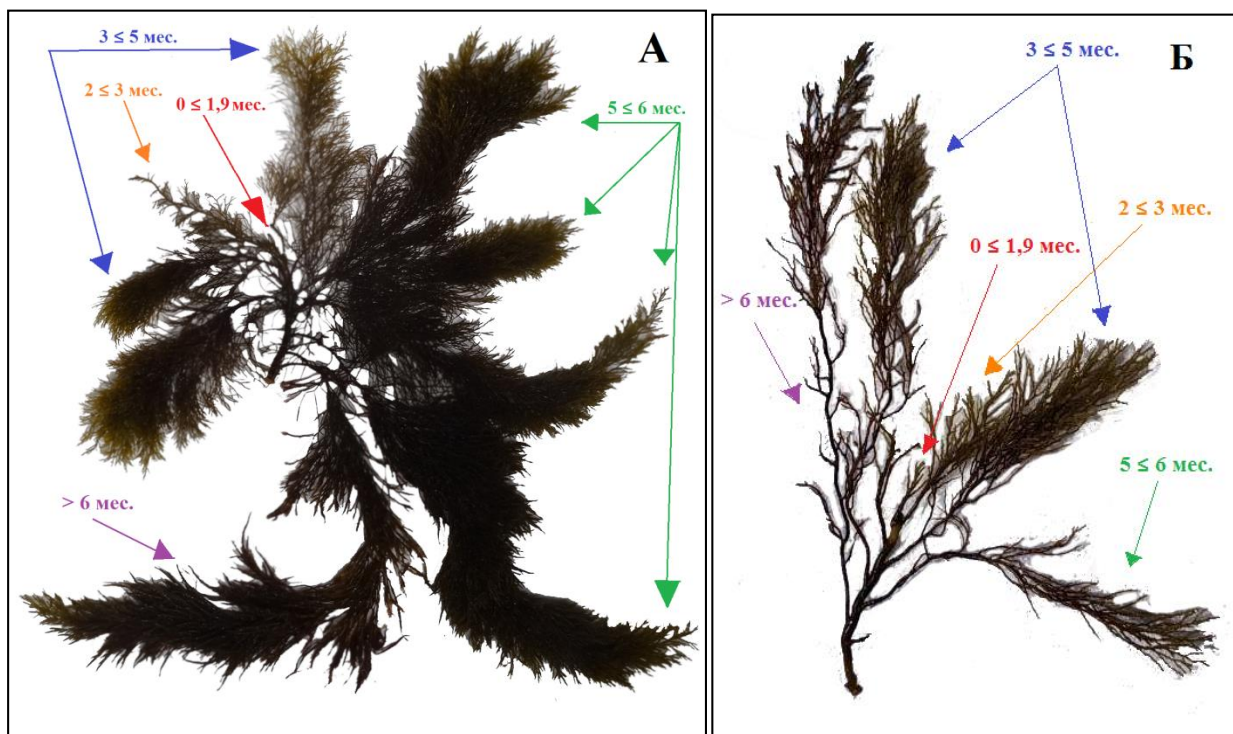


Рисунок 2.4 – Возрастные группы ветвей *Cystoseira barbata* (А) и *C. crinita* (Б)

2.4 Определение концентрации фукоксантина

Концентрацию пигмента измеряли методом препаративной ТСХ в экстрактах, полученных путем эффективного ступенчатого экстрагирования свежесобранных водорослей (1-2 часа после сбора) 96 % этиловым спиртом, по методике, основанной на нашем патенте [38]. Данный метод прост, обладает достаточной точностью и не требует применения дополнительного оборудования.

Ветви определенной возрастной группы трижды промывали дистиллированной водой для удаления видимых эпифитов, солей и высушены между листами фильтровальной бумаги при комнатной температуре. После этого ветви измельчали до размера 8-15 мм. Сухую массу ветвей определяли после высушивания навески в сушильном шкафу при температуре 105 °С.

Для анализа фукоксантина образцы водоросли массой $5 \pm 0,1$ г экстрагировали при комнатной температуре 2 раза, каждый раз добавляя по 15 мл 96 % этанола. Длительность экстракции была установлена опытным путем и составила 2 дня, так как на 3-й день не отмечено увеличение концентрации пигмента. Далее экстракты объединяли и подвергали препаративной ТСХ на стеклянных пластинах (20×20 см), покрытых слоем силикагеля толщиной 0,5 мм (Kieselgel 60 G, Merck No. 7731 (45 г) и дистиллированная вода (90 мл)).

Методика получения хроматографических пластин. Для получения закрепленного слоя сорбент фиксировали на стекле, в качестве фиксатора применяли гипс медицинский. Для приготовления хроматографических пластин устанавливали по уровню стол, закрепляли в нем необходимое количество вымытых и высушенных стеклянных пластин и с помощью шаблона наносили слой массы, состоящей из сорбента (Kieselgel 60 G, Merck No. 7731), связующего вещества и воды. После подсушивания слоя в течение 10-15 мин пластины переносили в кассеты и досушивали в горизонтальном положении при комнатной температуре.

Хроматографию проводили в системе ацетон - гексан (3:7). На пластину наносили стандарт фукоксантина (кристаллический Фк, выделенный ранее из

Cystoseira sp.) и полученный экстракт. Фракцию Фк собирали и растворяли в этаноле. Спектры Фк снимали на спектрофотометре СФ-2000. Содержание каротиноида (F_x, мг) в спиртовом экстракте рассчитывали по формуле [95]:

$$F_x = \frac{D \cdot V \cdot 10}{E_{1cm}^{1\%}}$$

где D – оптическая плотность при длине волны 448 нм; V - объем экстракта, мл; $E_{1cm}^{1\%}$ – коэффициент экстинкции, равный 1280 [174]. Концентрацию фукоксантина (C_{Fx}) рассчитывали на 1 г сухой массы водоросли. Все измерения выполняли в 4 повторностях. Все работы, связанные с выделением Фк, проводили, избегая попадания прямых солнечных лучей.

Метрологическая характеристика метода количественного анализа фукоксантина в бурых водорослях представлена в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Метрологическая характеристика метода количественного определения фукоксантина у *Cystoseira* sp.

№	Содержание	f(n-1)	Среднее	S ²	± S	P, %	t(p, f)	± ε %
1	0,061	9	0,061	2,1·10 ⁻⁶	0,0014	95	2,262	1,6
2	0,063							
3	0,059							
4	0,063							
5	0,062							
6	0,062							
7	0,061							
8	0,059							
9	0,060							
10	0,061							

Примечание: S² – дисперсия, S – стандартное отклонение, P – доверительная вероятность, ε % – относительная ошибка.

Согласно представленным данным можно сделать вывод, что метод позволяет довольно точно определять содержание фукоксантина в бурых водорослях, так как относительная ошибка определения не превышает $\pm 1,6$ %.

Для определения систематической ошибки методики количественного анализа фукоксантина в бурых водорослях был использован метод добавок стандарта. Полученные результаты укладываются в норму допустимых отклонений для спектрофотометрического метода (Таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Результаты количественного определения фукоксантина у *Cystoseira* sp. с использованием метода добавок стандарта фукоксантина

Исходное содержание, мг·г ⁻¹ сырья	Добавлено, мг	Содержание, мг·г ⁻¹ сырья		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная	относительная
0,061	0,065	0,126	0,129	+0,003	2,381
0,061	0,073	0,134	0,132	-0,002	1,492
0,061	0,110	0,171	0,173	+0,002	1,169
0,061	0,178	0,239	0,234	-0,005	2,092

2.4.1 Метод получения кристаллического фукоксантина и его физико-химические характеристики

Стандарт (кристаллический Фк) получен из *Cystoseira* sp. по методике, описанной в нашем патенте [37]. Свежесобранные талломы (500 г) промывали дистиллированной водой, обсушивали фильтровальной бумагой и измельчали до размера 2-3 см. Далее проводили экстракцию 96 % этанолом в массовом соотношении 1 : 3 в течение суток. В полученный экстракт добавляли равный объём воды для осаждения каротиноидосодержащего комплекса, который фильтровали на фильтре шотта (С3; диаметр 10 см) со слоем силикагеля 1 см (силикагель L 100\250 для хроматографии). Образующийся на фильтре с

силикагелем осадок, содержащий Фк, промывали 96 % этиловым спиртом (50 мл). Получали концентрированный раствор с содержанием пигмента 0,2-0,25 %.

Хроматографирование полученного раствора проводили в тонком слое на силикагеле с толщиной слоя 1 мм, активированном в течение 1 ч при 110 °С. Как элюент, использовали ацетон–н-гексан (3 : 7). Следует отметить, что хроматографирование Фк в тонком слое, по сравнению с колоночной хроматографией, имеет ряд преимуществ. Как видно на Рисунке 2.5, хроматограмма содержит много близлежащих полос пигментов, которые невозможно было бы отделить с помощью колоночной хроматографии без предварительной обработки, что существенно усложняло процесс. Через 1-2 часа хроматографирования оранжево-красную полосу Фк ($R_f = 0,30$) собирали и три раза экстрагировали ацетоном.

Экстракт упаривали в вакууме на роторном испарителе при температуре водяной бани не выше 30°C, осадок растворяли в хлороформе и дважды промывали водой. Хлороформенный раствор упаривали в вакууме. Полученный осадок растворяли в диэтиловом эфире, добавляли гексан и оставляли на 2-3 суток в тёмном месте при температуре 8°C. Осадок с выпавшим кристаллическим Фк центрифугировали (3000 об/мин) и промывали холодным гексаном. Из 500 г сырой массы водорослей выход кристаллического Фк составил 15 мг. Кристаллы Фк продували аргоном и хранили в тёмном месте.

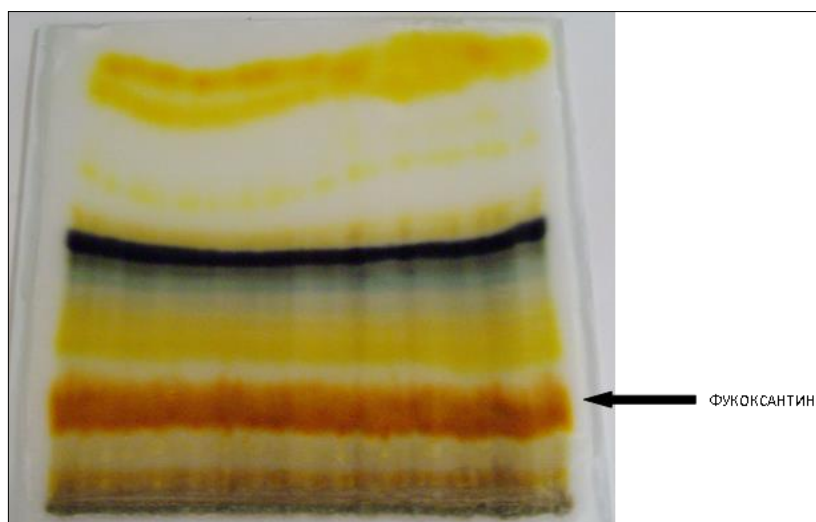


Рисунок 2.5 – Хроматограмма экстракта водоросли *Cystoseira* sp.

На Рисунке 2.6 представлены кристаллы Фк, полученные из черноморской цистозеры. Кристаллический Фк, выделенный по данной методике, не окисляется на воздухе и при умеренном освещении (отсутствие прямых солнечных лучей).

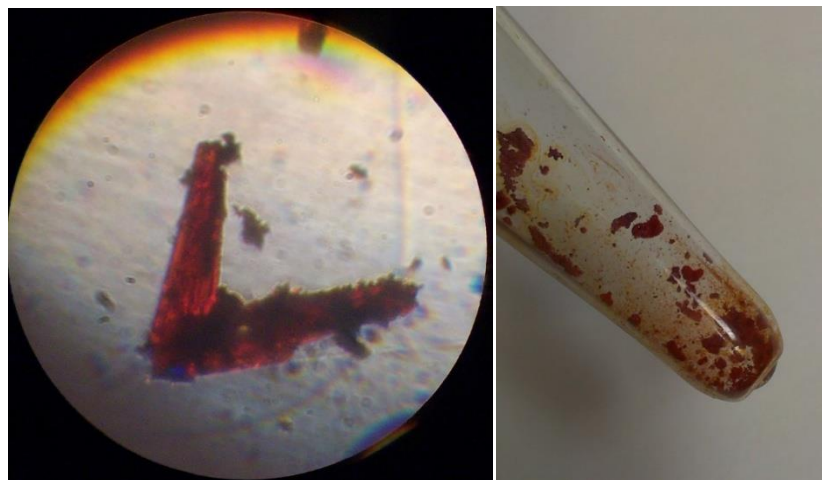


Рисунок 2.6 – Кристаллы фукоксантина

Физико-химические характеристики Фк (UV-VIS, HPLC, ^1H NMR) показаны на Рисунках 2.7, 2.8. HPLC проводили на жидкостном хроматографе Hitachi L-7100 (Tokyo, Japan), используя колонки с обращённой фазой (ODS-UG-5; 150 x 4,6 mm, Nomura Chemical Co., Aich, Japan), в качестве растворителя использовали метанол. ^1H NMR спектры (500 Mhz) Varian UNITY INOVA 500 снимали в CDCl_3 , внутренний стандарт TMS. Для подтверждения структуры выделенного Фк проведены качественные реакции на функциональные группы, входящие в состав молекулы, в соответствии с методиками, описанными в статье [128].

Реакция на карбонильную группу. 0,1 мг Фк растворяли в метаноле и добавляли 1 мг NaBH_4 . Через 2 мин добавляли воду и диэтиловый эфир. Эфирную фракцию промывали водой и снимали спектр в видимой области.

Реакция на гидроксигруппу. 0,1 мг Фк растворяли в 1 мл пиридина и добавляли 0,1 мл уксусного ангидрида. Через 1 ч добавляли воду и гексан. Гексановую фракцию отмывали водой и проводили хроматографию в тонком слое. Сложный эфир Фк имел намного большее значение R_f , чем начальный каротиноид.

Реакция на эпокси-группу: спектр хлороформенного раствора Фк снимали в видимой области, затем добавляли 1 каплю разбавленной соляной кислоты, при этом наблюдали изменения в спектре.

Кристаллический Фк состоит на 93,3 % из транс-фукоксантина и 6,7 % – цис-фукоксантина. Данные ^1H NMR-спектра подтверждают строение Фк, выделенного из цистозиры. Кристаллический фукоксантин впервые выделен Вильштеттером и Пейджем в 1914 году из бурых водорослей [288]. Молекулярная формула фукоксантина $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_6$, молекулярный вес - 658,9, точка плавления 168-169 °C [85], [86]. Структурная формула этого пигмента представлена на рисунке 2.8. При перекристаллизации из диэтилового эфира лёгкой фракции петролейного эфира (40-60 °C) он выпадает в виде оранжево-красных иголок с температурой плавления 166 – 168 °C [153]. По другим данным, кристаллический Фк после перекристаллизации из ацетона – н-гексана имеет $t_{\text{плавл.}} = 168 - 169$ °C, потери при перекристаллизации составляют 26 % [128].

Полученные нами из диэтилового эфира–н-гексана кристаллы Фк имеют $t_{\text{плавл.}} = 167 - 168$ °C. Спектры поглощения Фк в видимой области в ацетоне и гексане имеют максимумы поглощения, полностью совпадающие с описанными в литературе (λ_{max} (н-гексан): 448, 475 нм; λ_{max} (ацетон): 446, 467 нм) [128].

Хроматографическая подвижность пигмента $R_f = 0,30$ в системе ацетон – н-гексан (3:7) практически совпадает с литературными данными ($R_f = 0,26$) [128]. Структура Фк, выделенного из цистозиры, полностью подтверждается методом ИК-спектроскопии [168, 208]. ИК-спектр был снят в CCl_4 и имеет характерные максимумы, которые соответствуют литературным данным [128]: в см^{-1} ; 3482 (ОН-группа), 1929 (алленовая связь), 1731 (ацетат, $\text{C}=\text{O}$).

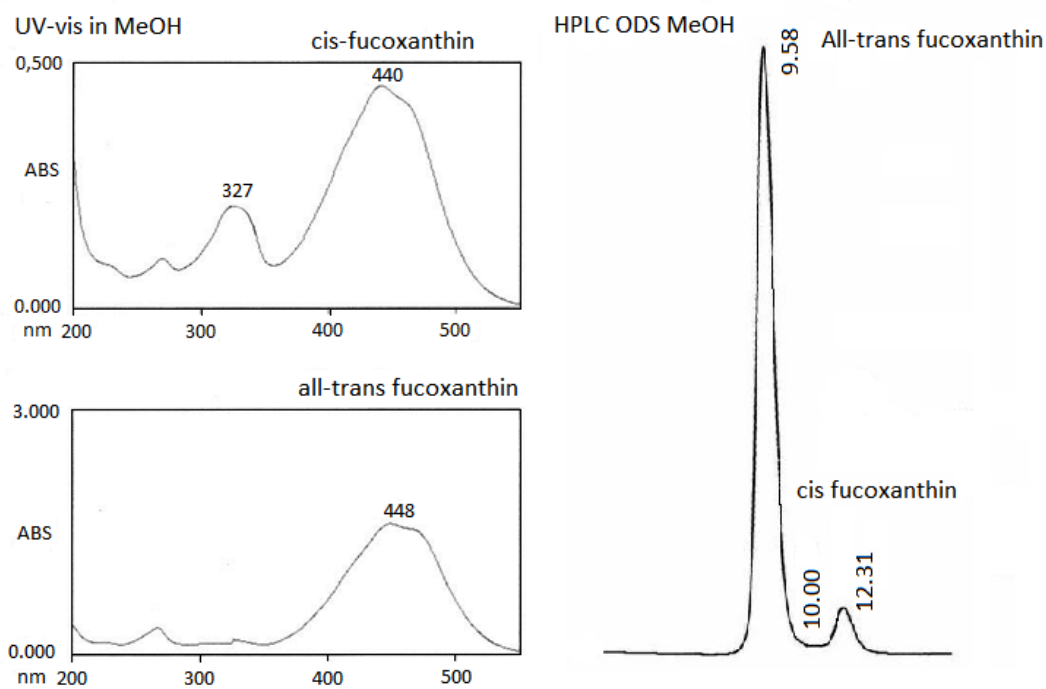


Рисунок 2.7 – HPLC и UV-VIS спектры фукоксантина

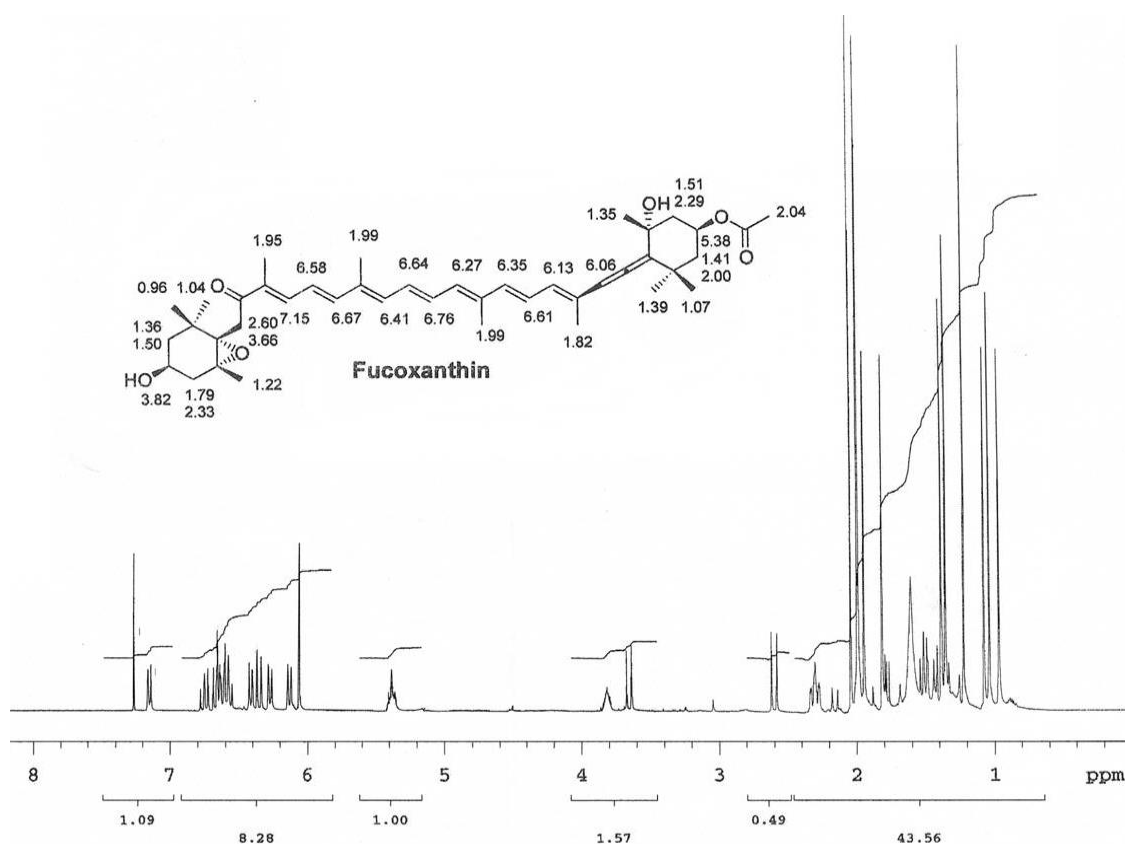


Рисунок 2.8 – ^1H NMR-спектр фукоксантина. Формула фукоксантина приведена из [85, 86]

2.5 Определение концентрации тяжёлых металлов в водорослях и грунте

Пробы водорослей после определения их видовой принадлежности и возраста высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при 105°C. После этого, отбирали навеску массой $1 \pm 0,01$ г. Пробы для анализа готовили методом мокрой минерализации в соответствии с [12]. К навеске добавляли окислитель (1 мл азотной кислоты), выдерживали 20 мин, затем проводили обугливание до прекращения выделения дыма. После окончания обугливания минерализацию проб проводили в муфельной печи в течение 6,5 ч, постепенно повышая температуру (на 50 °C через каждые 30 мин) до 450 °C. Минерализацию при этой температуре продолжали до получения серой золы. Минерализацию считали законченной, когда зола становилась белого или слегка окрашенного цвета, без обугленных частиц. При наличии обугленных частиц повторяли обработку золы раствором азотной кислоты и выдерживали при 470 °C. Пробу растворяли в 1 мл концентрированной соляной кислоты для растворения образца и доводили объем пробы до 20 мл дистиллированной водой, тщательно перемешивая.

Определение содержания тяжёлых металлов Pb, Cd, Cu и Zn проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра “SpectrAA-5” (Varian, Австралия) с использованием эталонов (медь ГСО №7998-93; свинец ГСО №7012-93; цинк ГСО №7837-2000; кадмий ГСО №6690-93).

Концентрацию тяжёлых металлов (C) в пробах определяли по формуле:

$$C = V (A - A_0) / m,$$

где V – объём исследуемого раствора, мл; A – концентрация тяжёлых металлов в растворе, мг·дм⁻³; A₀ – концентрация тяжёлых металлов в контрольной пробе, мг·дм⁻³; m – масса используемой навески сухих водорослей, мг. Концентрации тяжёлых металлов рассчитывали в микрограммах на 1 г сухой массы водоросли.

Анализируемые металлы определяли с использованием ламп со следующими линиями поглощения: для Zn - 213,9 нм; для Pb - 217,0 нм; для Cd - 228,8 нм; для Си - 324,8 нм. Чувствительность метода для каждого химического элемента составляет (мкг·мл⁻¹): Zn - 0,012; Pb - 0,035; Cu - 0,040; Cd - 0,015.

Для каждой возрастной группы ветвей *C. barbata* определено содержание 32 элементов: Al, As, Ba, Be, Bi, Br, Cd, Cu, Cr, Ge, F, Fe, Ga, Hg, La, Mn, Ni, P, Pb, Rb, Se, Sb, Si, Sr, Ti, Th, Y, U, V, W, Zn, Zr. Пробы водорослей после удаления видимых эпифитов промывали дистиллированной водой, доводили до постоянной массы в сушильном шкафу при 105°C и отбирали навеску водоросли массой $20,0 \pm 0,1$ мг. Далее пробы сжигали в HNO₃ (ос.ч.) в герметичных фторопластовых пробирках в автоклаве при 2 атм. Определение содержания элементов проводили методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на «PlasmaQuant MS Elite» (Analytik Jena AG, Германия) по методическим указаниям [16].

Все измерения выполнены в 4 повторностях для каждой возрастной группы. Анализы для каждого химического элемента проводили в 4 параллельных измерениях.

Пробы рыхлого грунта отбирали в Карантинной бухте и акватории Фороса с 4-5 участков. Далее пробы высушивали до постоянной массы при 105 °C в сушильном шкафу и просеивали через сито с диаметром пор 0,25 мм. После этого отбирали навеску массой $1 \pm 0,01$ г и проводили подготовку проб и определение металлов аналогично, как описано выше.

2.6 Определение содержания общих липидов и метиловых эфиров жирных кислот

Для определения метиловых эфиров жирных кислот выделяли липидную фракцию из *C. barbata* с помощью смеси Фолча [21]. Ветви макрофитов промывали дистиллированной водой, освобождали от видимых эпифитов, просушивали между листами фильтровальной бумаги и измельчали до размера 2-4 мм. К $5,0 \pm 0,1$ г сырой массы измельченных ветвей добавляли 15 мл смеси Фолча (1 : 1 хлороформ : спирт), через 2 суток полученный экстракт сливали и к водорослям добавляли новую порцию смеси (10 мл) с соотношением хлороформ : спирт 2:1, и через сутки экстракты объединяли. Далее полученные экстракты 2 раза промывали дистиллированной водой и аккуратно собирали нижнюю хлороформную фракцию,

после чего ее фильтровали через фильтровальную бумагу. Все анализы проводили в 4-х повторностях в банках из темного стекла, хранили в темном месте для последующего определения фукоксантина и липидов.

Содержание общих липидов определяли по цветной реакции с сульфофосфованилиновым реактивом. Для определения содержания липидов отбирали аликвоту хлороформного липидного экстракта объемом 0,1 мл, добавляли 0,5 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирок перемешивали и кипятили на водяной бане в течение 10 мин. Контрольную пробирку ставили как опытную с 0,1 мл воды. Пробирки вынимали и охлаждали до комнатной температуры. Далее добавляли фосфованилиновый реактив (0,5 мл) и тщательно перемешивали и оставляли пробы на 45 мин в темном месте. Далее определяли оптическую плотность проб при длине волны 530 нм на спектрофотометре СФ-2000 (Россия).

Концентрацию липидов (С, %) определяли по формуле:

$$C = \left(\frac{D_{530} \cdot K}{m} \right) \cdot 100 \%,$$

где D – оптическая плотность при длине волны 530 нм; K – коэффициент калибровки; m – масса навески.

Для определения жирных кислот сначала проводили метилирование стандартов (пальмитиновой и стеариновой кислот, Merck, Германия) и липидной фракции исследуемых проб по [21]. Объединённую из 4 параллелей хлороформную липидную фракцию упаривали, высушивали и взвешивали для определения общих липидов весовым методом. Далее добавляли 5 мл метанольного раствора NaOH и кипятили полученную смесь в течение двух часов. Остывшую смесь переносили в делительную воронку, добавляли несколько капель фенолфталеина. Затем проводили экстракцию гексаном (по 5 мл - 4 раза), собирали водно-спиртовый слой. В полученную смесь добавляли HCl до изменения окраса на синий и проводили повторную экстракцию гексаном (по 5 мл - 4 раза). Профильтрованную гексановую фракцию упаривали в роторном испарителе и добавляли 5 мл метанола, насыщенного соляной кислотой. Затем пробу кипятили в течение двух часов и

заново экстрагировали гексаном (4 раза), профильтрованная гексановая фракция содержала метиловые эфиры жирных кислот.

Определение жирных кислот проводили на газовом хроматографе «Хроматэк-Кристалл 5000.2» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Россия), оборудованного пламенно - ионизационным детектором и капиллярной колонкой Agilent (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм) в режиме программирования температуры: 1 мин при 60 °С, затем подъем до °С со скоростью 20 °С в мин, затем подъем до 290°С со скоростью 5 °С в мин, затем 10 мин при конечной температуре; температура испарителя 280 °С, ввод 1 мкл пробы без деления потока, скорость потока газа-носителя гелия 1 мл·мин⁻¹, диапазон сканирования масс: 50–450 m/e, энергия ионизации 70 эВ, температура ионного источника 230 °С, температура интерфейса 280 °С. Качественный анализ МЭЖК проведен по хроматограммам по полному ионному току сравнением полученных масс-спектров с библиотекой спектров NIST 17.

2.7 Статистический анализ экспериментальных данных

Статистическая обработка полученных данных проведена с помощью инструментов программ Microsoft Excel и OriginPro, где был выполнен анализ статистических отклонений, относительной и абсолютной погрешности измерений, полученных в экспериментальной части работы. На графиках приведены средние значения ± среднеквадратичное отклонение при $p \leq 0,05$. Для моделирования нормализованной кривой концентрации свинца применяли многослойную нейронную сеть [105], использующую машину опорных векторов [78].

ГЛАВА 3 СОДЕРЖАНИЕ ФУКОКСАНТИНА В БУРЫХ ВОДОРОСЛЯХ ЧЁРНОГО МОРЯ

Интенсивность и направленность анаболических процессов у морских водорослей во многом зависит от количества и соотношения пигментов их светособирающего комплекса [54]. Сезонные изменения факторов внешней среды (освещение, температура, интенсивность движения воды, концентрация биогенных элементов) ведут к адаптивным перестройкам комплекса и способствуют поддержанию у водорослей в течение года высокого уровня первичной продукции [233, 272]. Каротиноиды в бурых водорослях преимущественно состоят из фукоксантина, второго по важности ксантофилла - виолаксантина и β -каротина [117]. β -каротин хорошо известен как донор электронов для свободных радикалов, и, в частности, необходим для нейтрализации кислорода *in vitro* и *in vivo* [138]. Сильные антиоксидантные свойства β -каротина фруктов и овощей хорошо известны. Относительно меньшее внимание уделено изучению физиологических свойств каротиноидов морских водорослей. В последнее время активно исследуют основной пигмент бурых водорослей фукоксантин, который обладает сильными антиоксидантными свойствами и имеет значительную противораковую, противовоспалительную и др. активность [215].

Концентрация Фк в бурых водорослях в основном зависит от освещенности и температуры [233, 266]. Сильная корреляция фотосинтетической активности бурых водорослей с Фк в сочетании с температурой и светом может быть причиной сезонных изменений содержания Фк в цистозире. Изучение сезонности содержания пигментов может выявить факторы и механизмы, регулирующие продуктивность водорослевых сообществ в течение их вегетационного цикла. На данный момент сведения о содержании специфического для цистозир ксантофилла – фукоксантина немногочисленны и фрагментарны [59] и отсутствуют для *Cystoseira crinita*.

В данной главе представлены результаты определения концентрации Фк в разновозрастных морфоструктурных элементах бурых водорослей *C. barbata* и *C.*

crinita; сезонной динамики содержания пигмента в цистозирах из двух акваторий крымского побережья Чёрного моря с разным уровнем антропогенной нагрузки.

3.1 Концентрация фукоксантина в некоторых видах бурых водорослей

Предварительно была определена концентрация Фк в 5 видах бурых водорослей, отобранных в районе Балаклавской бухты. Содержание Фк в водорослях варьирует в диапазоне от $0,05 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сырой массы у *Padina pavonica* до $0,31 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ у *Cladostephus spongiosus* (Таблица 3.1). Концентрации Фк у первых четырех видов имеют близкие значения, в то время как *Padina pavonica* содержит значительно меньшее количество пигмента, что отличает её внешний вид от других бурых водорослей зеленоватым окрасом.

Таблица 3.1 – Содержание фукоксантина в некоторых видах бурых водорослей

Вид	Место обитания	Концентрация фукоксантина, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сыр}}$
<i>Cladostephus spongiosus</i>	Чёрное море	$0,31 \pm 0,09$
<i>Cystoseira barbata</i>	-	$0,25 \pm 0,05$
<i>Cystoseira crinita</i>	-	$0,22 \pm 0,06$
<i>Dictyota spiralis</i>	-	$0,18 \pm 0,03$
<i>Padina pavonica</i>	-	$0,05 \pm 0,01$
<i>Nizamuddinina zanardinii</i>	Аравийское море	$0,16 \pm 0,1$

В сравнительных целях исследовано содержание пигмента в бурой водоросли *N. zanardinii* из Омана [100]. Установлено, что макрофит является богатым источником Фк ($15,5\text{--}17,3 \text{ мг} \cdot 100 \text{ г}^{-1}$ сырой массы). Эти значения сравнимы с концентрацией пигмента у ламинарии *Saccharina japonica*, которая используется в Японии для промышленного производства Фк [174].

Ввиду того, что *C. barbata* и *C. crinita* имеют относительно высокую концентрацию Фк, а также являются массовыми видами бурых водорослей в

Чёрном море, на их примере рассмотрим сезонную динамику содержания Фк в макрофитах и концентрацию пигмента в зависимости от антропогенной нагрузки на акватории, в которых отбирали пробы.

3.2 Содержание фукоксантина в разновозрастных ветвях *C. barbata* и *C. crinita*

В онтогенетическом ряду ветвей первого порядка *C. barbata* и *C. crinita* (от 0,3 до 7 мес.) наблюдается одновершинное изменение концентраций Фк (рисунки 3.1 – 3.3). Максимум концентрации Фк в обоих видах цистозир приходится на возрастную группу ветвей от 2 до 3 мес. Содержание пигмента в ветвях *C. barbata* от 2 до 3 мес., собранных в Карантинной бухте в сентябре 2013 г., составило $3,0 \pm 0,1 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, в июне 2017 г. – $2,0 \pm 0,04 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$; в ветвях *C. crinita* той же возрастной группы – $1,6 \pm 0,02 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. Концентрация Фк в ветвях *C. barbata* от 2 до 3 мес., собранных в акватории пгт Форос в июле 2017 г., составила $1,9 \pm 0,01 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$; в ветвях *C. crinita* – $0,8 \pm 0,01 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$.

Содержание Фк в ветвях возрастом от 3 до 7 мес. и старше, остается относительно постоянным для *C. crinita*, а для *C. barbata*, собранных на двух станциях в июне-июле 2017 г., равномерно снижается после 3 мес.

Концентрация пигмента в ветвях *C. barbata* выше, чем в ветвях *C. crinita*.

Характер онтогенетических изменений содержания Фк и интенсивности фотосинтеза [46, 56] во многом совпадают. Во всех случаях это одновершинная зависимость с максимумом названных характеристик у ветвей в возрастном диапазоне от 2 до 3 мес.

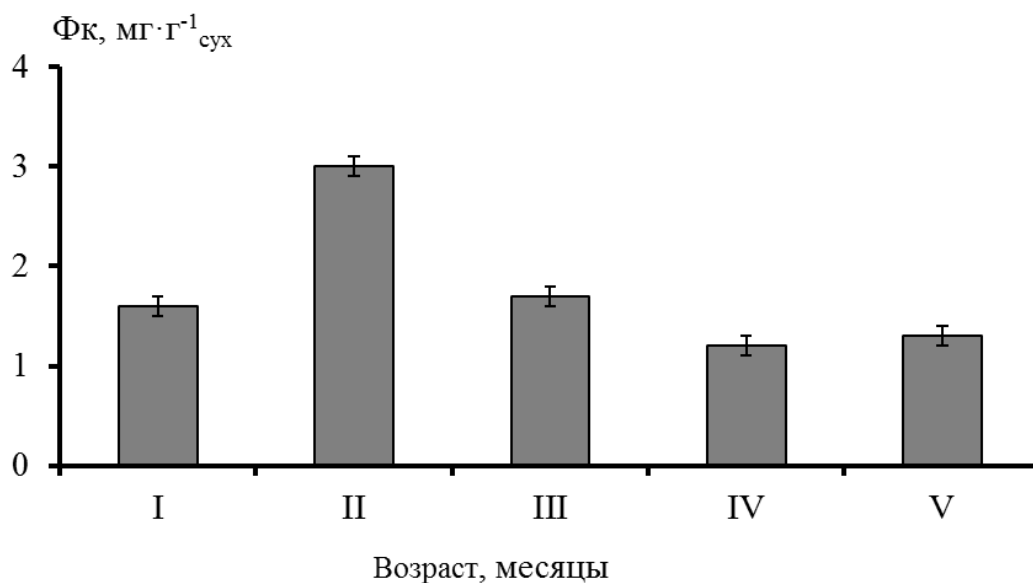


Рисунок 3.1 – Концентрации фукоксантина (Фк) в ветвях первого порядка *Cystoseira barbata* (Карантинная бухта, сентябрь 2013 г.). Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

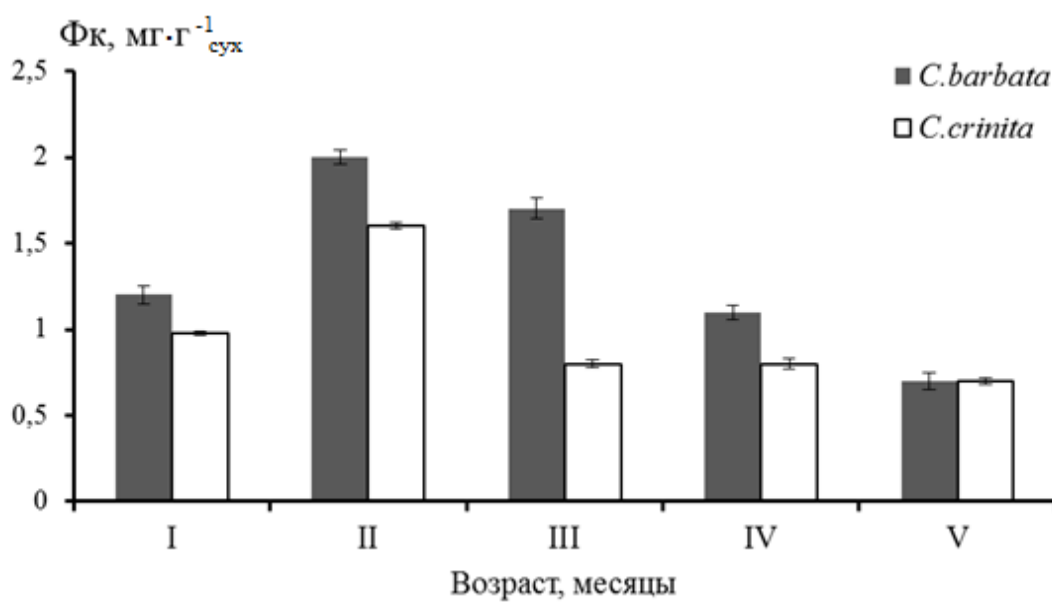


Рисунок 3.2 – Концентрации фукоксантина (Фк) в ветвях первого порядка *Cystoseira barbata* и *C. crinita* (Карантинная бухта, июнь 2017 г.). Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

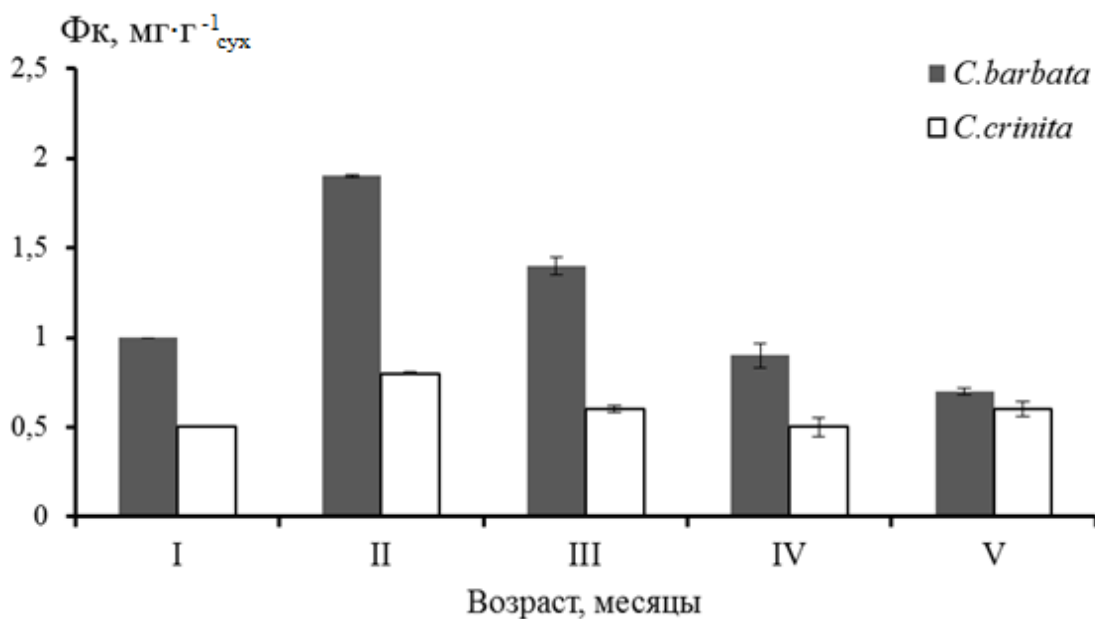


Рисунок 3.3 – Концентрации фукоксантина (Фк) в ветвях первого порядка *Cystoseira barbata* и *C. crinita* (Форос, июль 2017 г.). Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – 2 ≤ 3 мес., III – 3 ≤ 5 мес., IV – 5 ≤ 6 мес., V – 6 > мес.

Морфологическая структура ветвей этого возраста полностью сформирована, в структуре представлены все порядки ветвления, удельная поверхность достигает своего максимума. В осевой структуре ветвей в возрасте до 2 мес. доминирующее положение по массе занимают структуры первого порядка, обладающие невысокими значениями удельной поверхности и интенсивности фотосинтеза [45, 46, 56].

Обратим внимание, что ветви этого же возраста имеют относительно низкие значения содержания Фк (рисунки 3.1 – 3.3). Необходимо отметить, что, начиная с четырехмесячного возраста, наблюдается разрушение морфологической структуры ветвей, и, в первую очередь, происходит опадение осей высших порядков ветвления, увеличивается доля осевых структур низших порядков, обладающих невысокими значениями интенсивности фотосинтеза [45]. Возможно, это может быть одним из объяснений снижения содержания Фк в ветвях старше четырех месяцев.

Учитывая онтогенетические изменения морфологической структуры (соотношение массы ствола и суммарной массы ветвей) слоевищ *C. barbata* и,

используя средние величины концентраций Фк в стволах и ветвях, получены расчётные значения концентраций Фк в слоевищах разного возраста (Рисунок 3.4) [242].

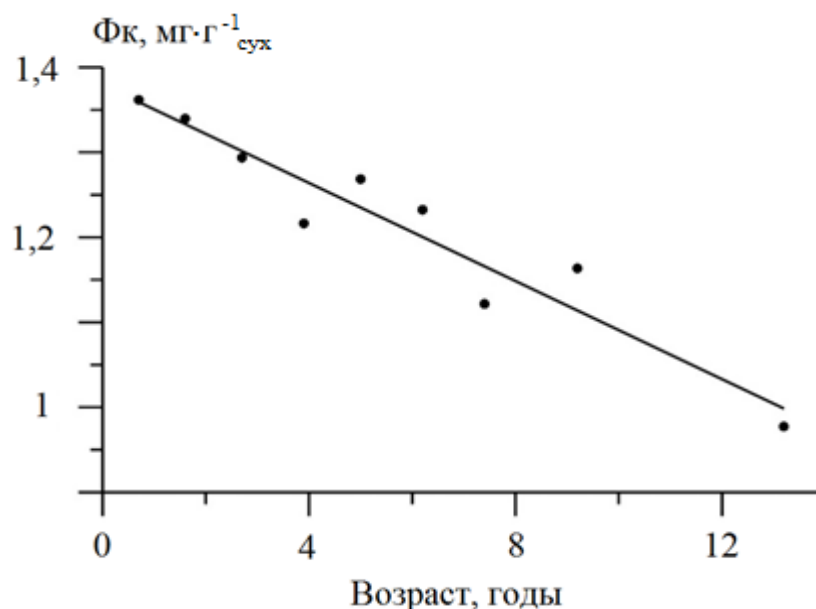


Рисунок 3.4 – Изменение концентрации фукоксантина (Фк) в онтогенезе слоевищ (Т, годы) бурой водоросли *Cystoseira barbata*

Эта зависимость хорошо описывается линейной функцией с высоким коэффициентом детерминации ($R^2 = 0,96$):

$$\text{Фк} = 1,379 - 0,029 T,$$

где Фк – концентрация фукоксантина, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$; Т – годы.

Поскольку у цистозир в онтогенетическом ряду ветвей первого порядка максимум содержания Фк приходится на ветви возрастом от 2 до 3 мес., исследуем сезонные изменения концентрации Фк для этой возрастной группы.

3.3 Годовая динамика содержания фукоксантина в ветвях *C. barbata* и *C. crinita*

Годовая динамика содержания Фк у обоих видов водорослей имеет хорошо выраженные периоды максимума и минимума, особенно в макрофитах из акватории Фороса (Рисунок 3.5). Максимальная концентрация Фк в ветвях *C. barbata* отмечена в январе ($2,4 \pm 0,03 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), а минимальная – в мае ($0,9 \pm 0,07 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), для *C. crinita* максимум отмечен также в январе ($1,7 \pm 0,02 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), минимум – в мае ($0,7 \pm 0,04 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). В ветвях *C. barbata* из Карантинной бухты максимальная концентрация пигмента обнаружена в январе ($2,7 \pm 0,08 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), минимальная – в марте ($1,4 \pm 0,01 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). В ветвях *C. crinita* максимум найден в январе ($2,6 \pm 0,10 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), минимальные концентрации зафиксированы в мае и июле ($1,1 \pm 0,01 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). На протяжении всего периода наблюдений, независимо от места отбора проб, содержание Фк в ветвях *C. barbata* всегда выше, чем в ветвях *C. crinita*.

В целом, для обоих видов цистозир пик содержания Фк приходится на осенне-зимний период. Даже притом, что исследованные нами цистозиры являются близкородственными видами, при одинаковых экологических условиях *C. barbata* на протяжении всего периода наблюдения имела более высокое содержание Фк, чем *C. crinita*. Вероятно, это связано с тем, что *C. barbata* обитает в относительно закрытых участках моря и бухтах, поэтому ввиду специфического строения слоевища она менее гибкая и стойкая к условиям высокой прибойности. *C. barbata* встречается также и у открытых берегов, но на больших глубинах, в условиях отсутствия влияния шторма. У берега поселение цистозир состоит в основном из *C. crinita*, а *C. barbata* растет в середине зарослей *C. crinita* или между крупными валунами на большей глубине [18].

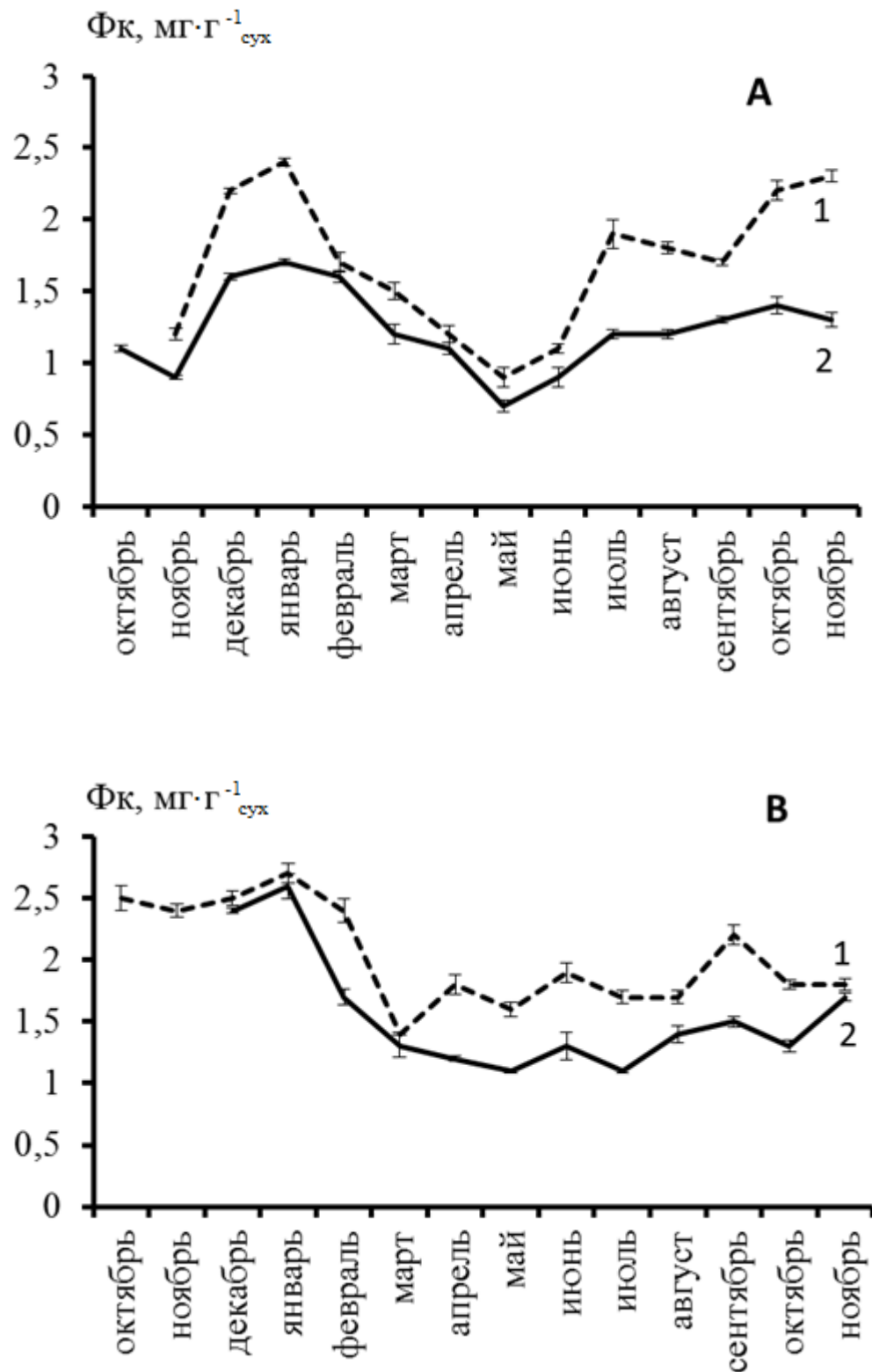


Рисунок 3.5 – Сезонная динамика содержания фукоксантина в 2-3-месячных ветвях *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2), собранных у Фороса (А) и в Карантинной бухте (В)

Ряд авторов изучали сезонные изменения содержания Фк в некоторых видах бурых водорослей (Рисунок 3.6). Так, максимальные концентрации Фк в *Cystoseira hakodatensis* отмечены в зимний и весенний периоды, причем весной концентрация была выше [226]. Значения концентрации Фк в *C. hakodatensis* зимой и весной были в 1,5 раза выше, чем в черноморских цистозирах. В *Cystoseira schiffneri* в наибольшем количестве Фк найден в летний период (76 ± 5 % от общего количества каротиноидов), осенью его концентрация значительно ниже (42 ± 4 %) [248]. В *Cystoseira indica*, собранной на юго-восточном побережье Ирана, максимальная концентрация Фк найдена в декабре ($3,56 \pm 0,20$ мг·г⁻¹_{сух}) [130], причем концентрация пигмента выше, чем в черноморских цистозирах. Ранее было установлено, что в талломе *C. barbata* летом обнаружено минимальное количество ксантофиллов, а в осенне-зимний период количество ксантофиллов возрастало. Максимальную интенсивность фотосинтеза цистозире наблюдали в летний и раннеосенний период (сентябрь) [59].

Увеличение содержания Фк, наблюдаемое с декабря по март, может быть вызвано накоплением пигментов или интенсивным ростом таллома макрофита, сопровождающимся снижением содержания сухого вещества и увеличением удельной поверхности. Интенсивные процессы роста требуют больших энергетических затрат, а также запасов углерода для синтеза структурных элементов, что может вызывать дополнительное развитие фотосинтетического аппарата. Это подтверждается увеличением размеров светособирающего комплекса в весенний период. Поскольку в зимний период более востребована функция светосбора, синтез ксантофиллов переключается на образование Фк за счет снижения содержания виолаксантина [28].

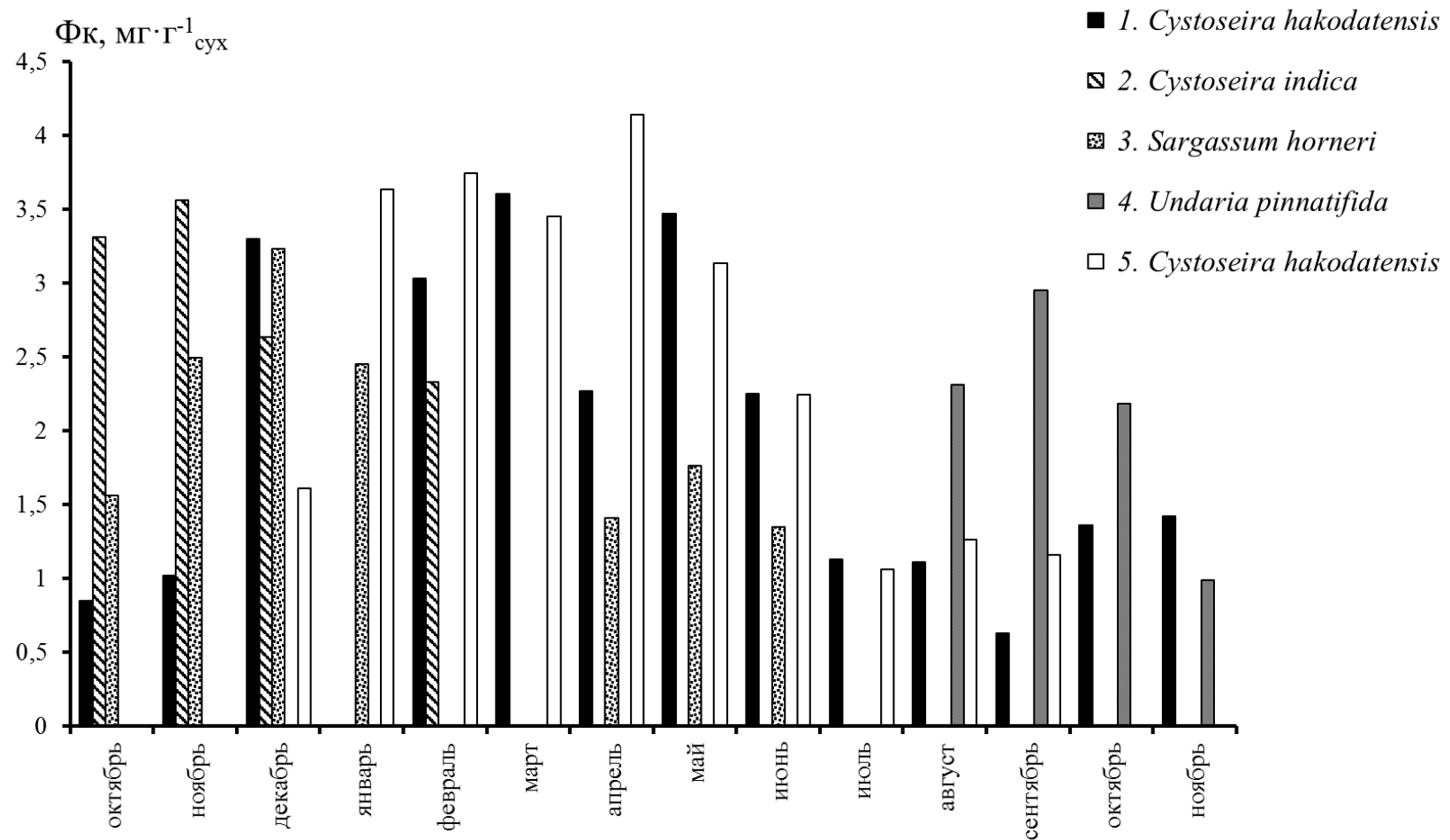


Рисунок 3.6 – Сезонная динамика концентрации фукоксантина (Фк) в бурых водорослях: 1, 5 - *Cystoseira hakodatensis* [226]; 2 - *Cystoseira indica* [130]; 3 - *Sargassum horneri* [226]; 4 - *Undaria pinnatifida* [138]

3.4 Концентрация фукоксантина в стволах цистозир

Для исследования годовой динамики концентрации Фк в стволах *C. barbata* выбран возрастной период 3,3-4,7 лет (длина ствола 9-13 см), в стволах *C. crinita* – 3,6-4,7 лет (длина ствола 10-13 см) ввиду наибольшей распространенности данной возрастной группы для обоих видов цистозир. Показано, что концентрация Фк в стволах *C. barbata* на протяжении всего периода исследования значительно ниже, чем у *C. crinita* (Рисунок 3.7). Содержание пигмента в стволах значительно ниже, чем в ветвях. В стволах *C. crinita* в обоих местах отбора проб наблюдали минимум содержания Фк в марте. В этот период в стволах *C. crinita* из акватории Фороса концентрация пигмента составила $0,30 \pm 0,02 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, в Карантинной бухте – $0,36 \pm 0,03 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$.

В стволах *C. crinita* из Карантинной бухты второй минимум концентрации обнаружен в июле ($0,30 \pm 0,03 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). Для *C. barbata* минимальное содержание пигмента в Карантинной бухте отмечено в мае ($0,1 \pm 0,005 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), а в акватории Фороса – в апреле ($0,08 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). В стволах *C. barbata* наибольшее содержание пигмента отмечено в осенне-зимний период, в Карантинной бухте – в октябре ($0,55 \pm 0,02 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), в Форосе – в декабре ($0,52 \pm 0,02 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). В стволах *C. crinita* максимальная концентрация Фк отмечена в акватории Фороса в ноябре ($0,67 \pm 0,01 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), а в Карантинной бухте – в апреле ($0,75 \pm 0,03 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$).

Разница в концентрации Фк в стволах цистозир разных видов связана, вероятно, с их морфологическими особенностями. Стволы *C. barbata* отличаются от стволов *C. crinita* отсутствием гладкой наружной оболочки, большей толщиной и наличием значительного количества эпифитов, что делает слоевище *C. barbata* менее гибким и стойким к высокой прибойности и объясняет её приуроченность к защищенным участкам моря [18].

Минимальная концентрация пигмента в весенний период связана, вероятно, с процессом размножения цистозир. Весной, с апреля по май, в довольно сжатые сроки происходит массовое созревание оогониев и антеридиев и выход половых

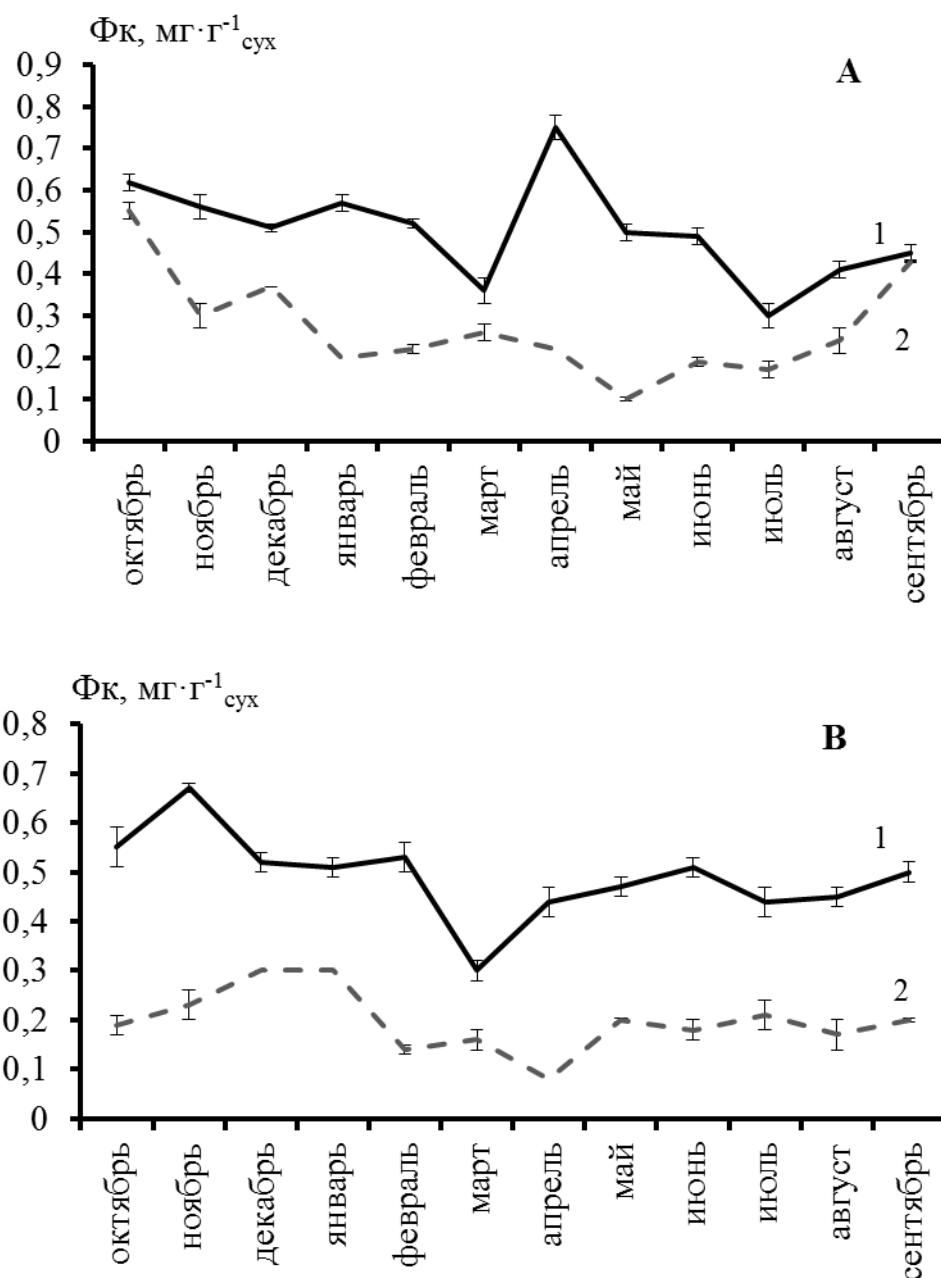


Рисунок 3.7 – Сезонная динамика концентрации фукоксантина (Фк) в стволах *Cystoseira crinita* (1) и *C. barbata* (2) в Карантинной бухте (А) и акватории Фороса (В)

продуктов [18]. В осенне-зимний период, когда не происходит размножение цистозир, при низкой температуре воды и уровне света концентрация Фк в талломах бурых водорослей увеличивается [96, 113, 272].

Отмечена тенденция к увеличению содержания Фк в стволах *C. crinita* с увеличением возраста таллома (Таблица 3.2). Для *C. barbata* такой зависимости выявлено не было.

Таблица 3.2 – Концентрация Фк в разновозрастных стволах *C. crinita* из акватории Фороса

Месяц отбора проб	Возраст таллома, лет	Концентрация Фк, $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$
октябрь	2,6-2,9	$0,55 \pm 0,03$
	4,0-5,0	$0,71 \pm 0,02$
ноябрь	3,3-3,6	$0,52 \pm 0,02$
	8,5	0,74
декабрь	3,6-4,3	$0,50 \pm 0,01$
	5,0-5,7	$0,60 \pm 0,02$
	7,1-7,5	$1,1 \pm 0,02$
январь	0,5-1,5	0,53
	2,9-3,6	0,61
	4,7-6,1	$0,66 \pm 0,02$
февраль	2,9-3,6	0,51
	6,8-7,8	0,53
июнь	2,9-4,0	$0,51 \pm 0,02$
	5,4-6,4	$0,55 \pm 0,01$

3.5 Зависимость содержания фукоксантина в бурых водорослях от уровня инсоляции

Существует много исследований функциональных свойств Фк в водорослях – это фотосинтез, защита от оксидативного стресса и т.д. [158, 180, 227, 245, 265]. Для бурых водорослей отмечено повышение концентрации пигментов при низкой

температуре и уровне света [96, 113, 272]. Производство Фк в качестве вспомогательного пигмента модулируется низким уровнем освещенности в течение зимнего периода через ксантофилловый цикл [177, 178, 272]. При низких уровнях освещенности требуется более высокое содержание пигмента, чтобы собрать аналогичное количество фотонов, как при высоком уровне освещенности.

Этот механизм, вероятно, оптимизирует содержание пигмента, чтобы эффективно использовать низкий уровень освещения и сохранять энергию для других целей, таких как рост [54, 96, 113]. Так, у бурой водоросли *Undaria pinnatifida* отмечена максимальная скорость фотосинтеза в течение зимней фазы роста (при низкой температуре воды) и низкая скорость - во время летнего старения (при высокой температуре). Поэтому снижение температуры и солнечного света может спровоцировать более высокую скорость фотосинтеза для роста, что, в свою очередь, увеличит содержание Фк в водорослях в зимний период.

С увеличением глубины связаны изменения физических факторов, к которым можно отнести падение интенсивности освещения и уменьшение скорости обмывания талломов водой, влияющие на фотосинтез, содержание пигментов и поглощение минеральных веществ из воды. Повышение содержания фотосинтетических пигментов при увеличении глубины произрастания отчетливо проявляется у бурых водорослей *Fucus distichus* и *Laminaria saccharina* [28]. Увеличение содержания фотосинтетических пигментов с глубиной – хорошо изученная адаптивная перестройка фотосинтетического аппарата, связанная со снижением интенсивности освещения [28, 54, 121].

Бурые водоросли рода *Cystoseira* относятся к массовым видам макрофитов в прибрежье Чёрного моря и являются перспективными источниками получения Фк. Поэтому важно определить факторы внешней среды, влияющие на содержание биологически ценных веществ водорослей, включая Фк. Особое влияние на пигментный состав водорослей оказывает уровень инсоляции, что, в частности, сказывается на содержании Фк в макрофитах.

Известно, что проникаемость морской воды для светового излучения сильно зависит от состояния загрязнённости воды различными химическими

соединениями, образующими плёнку на водной поверхности. Однако для глубин до одного метра, при отсутствии загрязнителей и биологических объектов у поверхности, ослабление интенсивности светового потока незначительно, так как существенное снижение наблюдается на глубине более 2-4 метров [271]. В нашем исследовании пробы цистозир отбирали на глубинах до 1 м.

Найдено, что уровень концентрации Фк снижается в летний период, когда возрастает общая освещённость (Рисунок 3.8). По мере снижения энергии светового потока наблюдается постепенное восстановление уровня Фк в массе растения. Подобная динамика Фк может свидетельствовать о двойной функции пигмента, выступающего, с одной стороны, в роли сенсibilизатора светособирающих комплексов растения при низкой инсоляции, а при высоких показателях энергии светового потока – напротив, реализуется его антиоксидантная функция, модулирующая защитные процессы, ассоциированные с подавлением процессов фотолиза в растениях [26, 234].

Для нашего региона поверхностная температура воды зависит от уровня инсоляции и коррелирует с энергией светового потока. В целом, температура воды оказывает меньшее влияние на фотосинтез бурых водорослей, чем энергия светового потока. Так, при уменьшении температуры воды в местах отбора проб от 25 °C до 15 °C уровень фотосинтеза *Undaria pinnatifida* снизился на 5 % [290]. В исследованиях с тем же видом водоросли показано сезонное снижение скорости фотосинтеза на 60 %, хотя диапазон изменений температуры в течение года составил всего 3 °C [96].

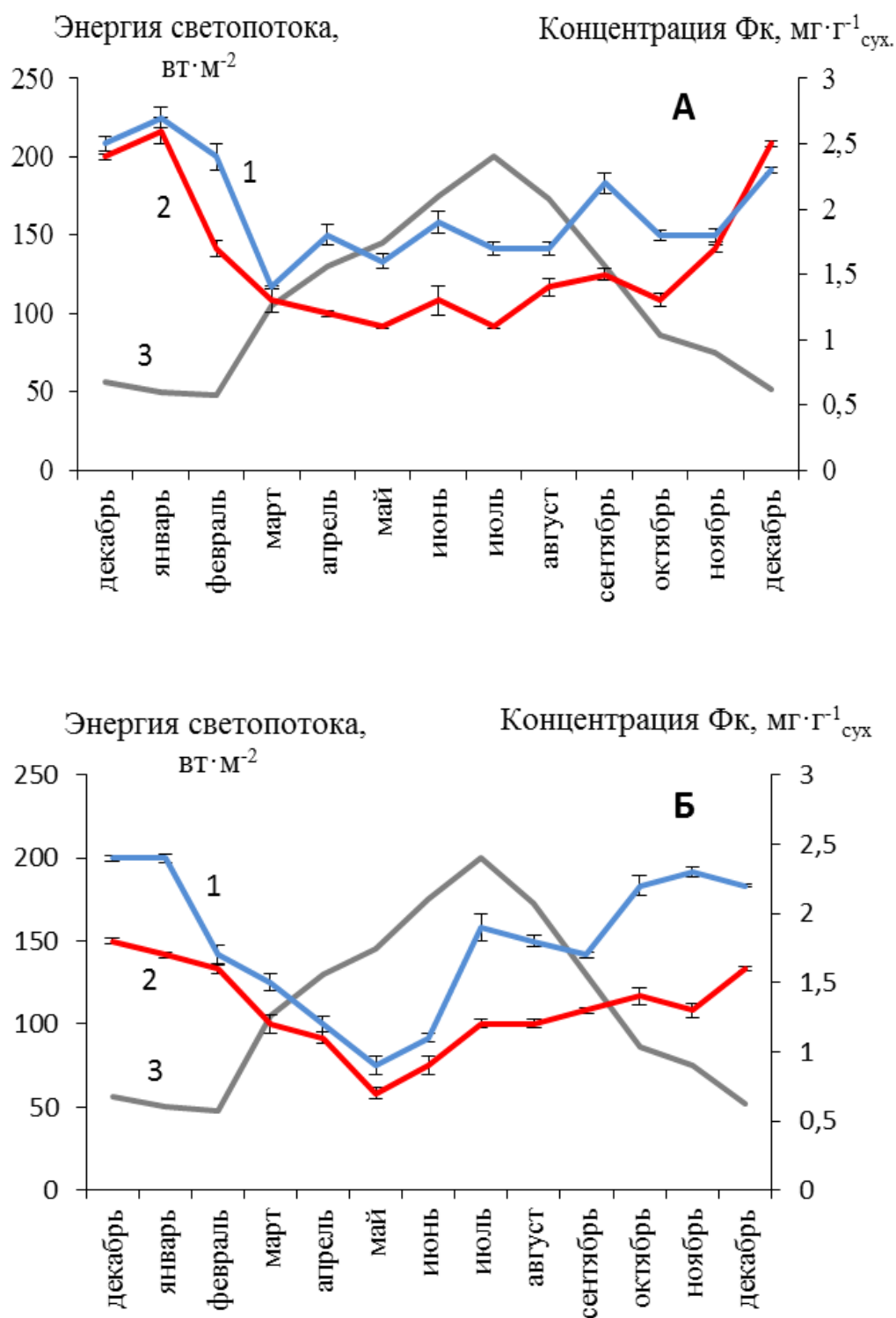


Рисунок 3.8 – Годовая динамика концентрации фукоксантина (среднее значение $\pm$ SD) в бурых водорослях *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) (из Карантинной бухты (А) и акватории Фороса (Б)) и энергии светового потока (3) [232]

Также показано, что снижение видового разнообразия бурых водорослей в высоких широтах в бóльшей степени связано с действием полярной ночи (длительное отсутствие освещения), чем с понижением температуры [29]. Таким образом, освещение оказывает более сильное влияние на концентрацию фотосинтетических пигментов, чем температура среды обитания макрофитов.

Значения энергии светопотока для двух мест отбора проб были получены из данных спутникового мониторинга уровня инсоляции земной поверхности [232]. Для анализа данных использовали программное обеспечение OriginLab OriginPro 2015. Ввиду наличия большого количества пиковых показателей, с ростом модальностей в области высоких значений энергии светового потока проведена процедура сглаживания с целью устранения «шума» при построении функциональной зависимости (Рисунок 3.9).

Применение метода сглаживания актуально за счёт возможности использования нескольких методов обработки, опирающихся на характеристики сигнала и шума, содержащегося в данных. Каждый метод предлагает различную производительность, чтобы наилучшим образом показать существенные аспекты результатов: метод Савицкого-Голая [250] позволяет сохранить формы пиков; при смежном усреднении возможно провести широкое сглаживание; устранить шум с аномальной амплитудой позволяет процентильный фильтр. В нашем случае применен алгоритм Савицкого-Голая, поскольку он использует локальную регрессию пиковых значений, выбивающихся из общего тренда. Сглаженный график зависимости обладает лучшими показателями для последующего моделирования функциональной зависимости концентрации Фк от освещённости.

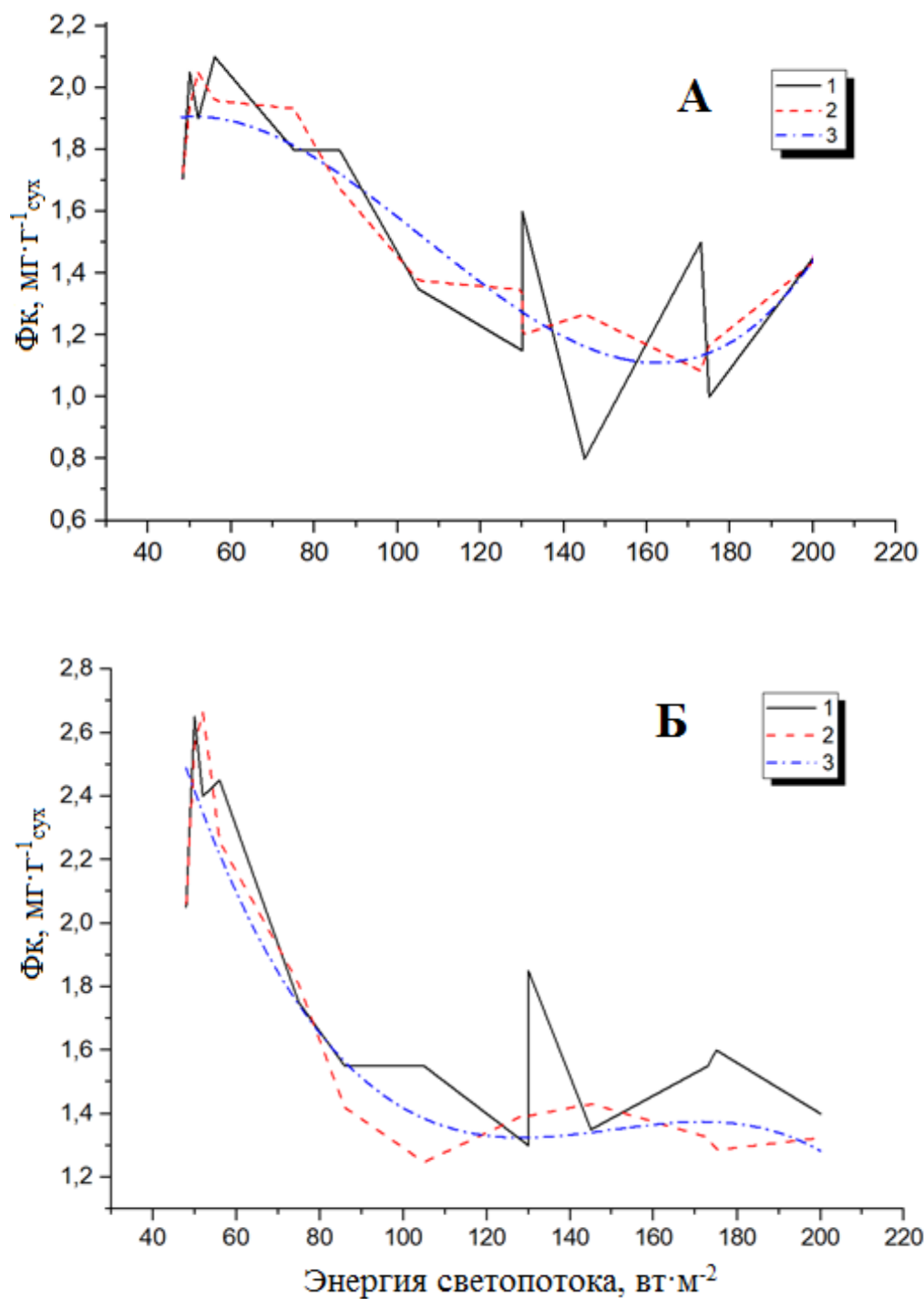


Рисунок 3.9 – Усреднённые концентрации фукоксантина в цистозирах в зависимости от освещённости (1); показатели после процедуры сглаживания (2), зависимость концентрации Фк от энергии светового потока (3). А – акватория Фороса; Б – Карантинная бухта

Моделирование уравнения зависимости проведено методом полиномиальной подгонки, реализованной с помощью машины Тьюринга [218], используя программное обеспечение OriginPro. В итоге, для обеих концентрационных кривых была получена кубическая зависимость, описываемая уравнением вида:

$$y=a+b_1x+b_2x^2+b_3x^3, \quad (3.1)$$

где a – варьируемая константа, b_1 - b_3 коэффициенты поправки функции.

Для графических зависимостей установлены значения поправочных коэффициентов (Таблица 3.3).

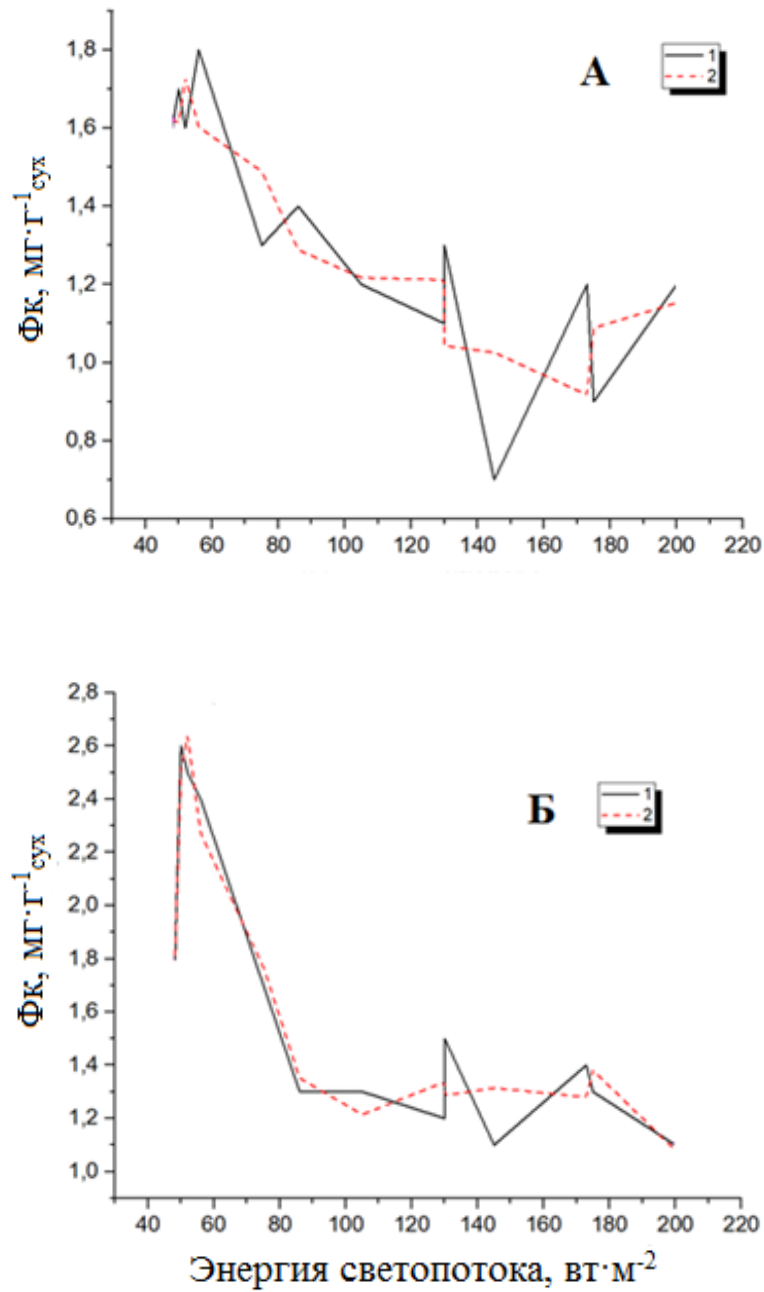
Таблица 3.3 – Значения коэффициентов уравнения 3.1. a – варьируемая константа, b_1 - b_3 – коэффициенты поправки функции, r^2 – коэффициент детерминации

Коэффициенты	Акватория Фороса		Карантинная бухта	
	значение	ошибка	значение	ошибка
a	1,25	0,59	4,74	0,81
b_1	0,03	0,02	-0,07	0,03
b_2	$-3,70 \cdot 10^{-4}$	$1,61 \cdot 10^{-4}$	$4,59 \cdot 10^{-4}$	$2,19 \cdot 10^{-4}$
b_3	$-1,15 \cdot 10^{-6}$	$4,37 \cdot 10^{-7}$	$-1,02 \cdot 10^{-6}$	$5,95 \cdot 10^{-7}$
r^2	0,90		0,88	

Высокие значения коэффициента детерминации показывают, что полученные результаты хорошо описываются уравнением 3.1. Как видно на рисунке 3.9, сглаженная кривая концентрации Фк в цистозирах в зависимости от освещённости имеет локальные минимумы при различных энергиях светового потока: $160 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ для образцов из акватории пгт Форос (Рисунок 3.9 А) и $125 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ для образцов из Карантинной бухты (Рисунок 3.9 Б). Данный факт, несмотря на математическую идентичность построенных зависимостей, указывает на необходимость повидового разделения, так как изначально приведены усреднённые показатели содержания пигмента в цистозирах.

Обработка данных по концентрации Фк в *C. crinita* и *C. barbata* для акватории Фороса и бухты Карантинной проведена идентичным методом, что и для

усреднённых показателей. В итоге, получен набор из четырёх функций, которые также отнесены к показателям энергии светового потока. На первом этапе проведено сглаживание моделируемой функции (Рисунок 3.10).



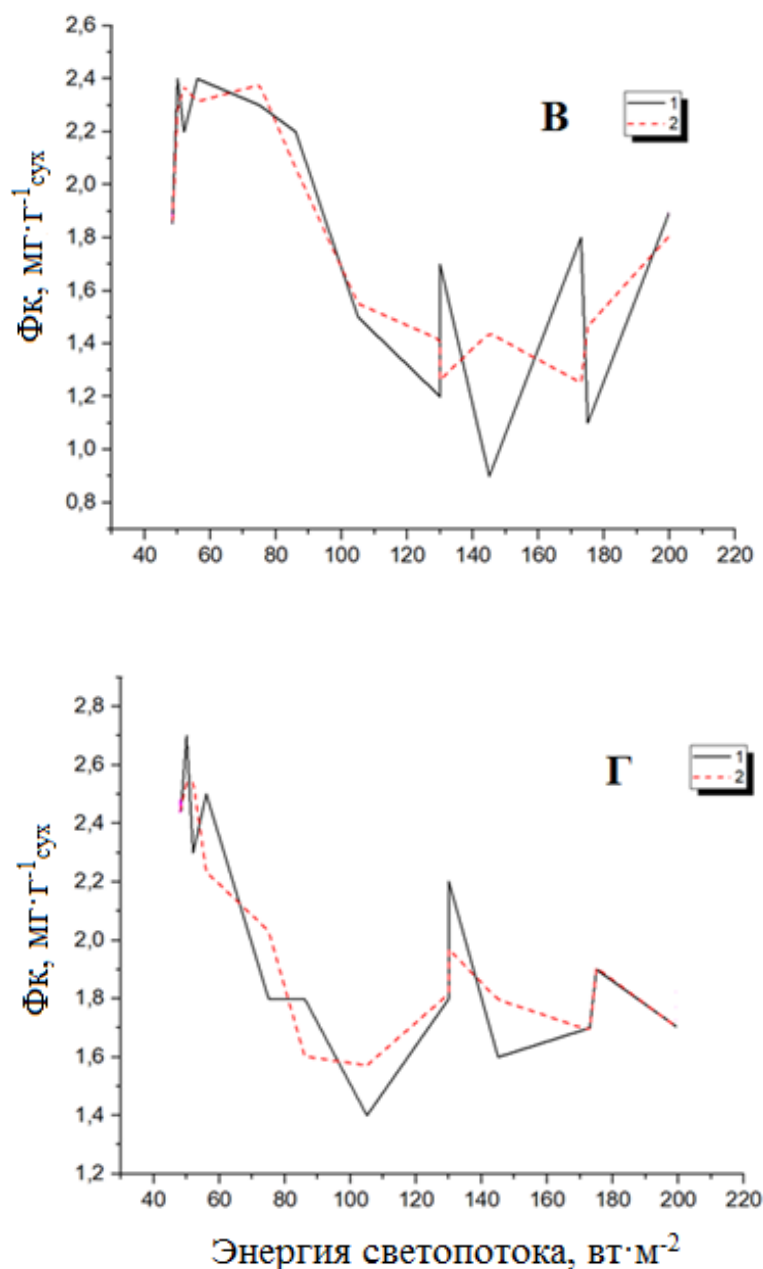


Рисунок 3.10 – Исходные концентрации фукоксантина в бурых водорослях *S. crinita* (А, Б) и *S. barbata* (В, Г) в зависимости от уровня освещённости (1); аналогичные показатели после процедуры сглаживания (2). А, В – акватория Фороса; Б, Г – Карантинная бухта

Для всех концентрационных кривых получен ряд кубических зависимостей, описываемых уравнением типа:

$$y=a+b_1x+b_2x^2+b_3x^3, \quad (3.2)$$

Параметры уравнения 3.2 приведены в Таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Значения коэффициентов уравнения 3.2. a – варьируемая константа, b_1 - b_3 – коэффициенты поправки функции, r^2 – коэффициент детерминации

Коэффициенты	Акватория Фороса			
	<i>C. crinita</i>		<i>C. barbata</i>	
	значение	ошибка	значение	ошибка
a	1,87	0,83	0,12	1,56
b ₁	8,27·10 ⁻⁵	0,03	0,08	0,05
b ₂	-1,08·10 ⁻⁴	2,24·10 ⁻⁴	-8,54·10 ⁻⁴	4,24·10 ⁻⁴
b ₃	4,54·10 ⁻⁷	6,09·10 ⁻⁷	2,58·10 ⁻⁶	1,15·10 ⁻⁶
r ²	0,69		0,97	
	Карантинная бухта			
	<i>C. crinita</i>		<i>C. barbata</i>	
	значение	ошибка	значение	ошибка
a	5,14	1,34	5,45	0,68
b ₁	-0,08	0,04	-0,09	0,02
b ₂	5,81·10 ⁻⁴	3,63·10 ⁻⁴	6,89·10 ⁻⁴	1,84·10 ⁻⁴
b ₃	-1,35·10 ⁻⁶	9,86·10 ⁻⁷	-1,68·10 ⁻⁶	4,99·10 ⁻⁷
r ²	0,71		0,83	

По результатам полиномиального анализа построены графические зависимости, описывающие динамику концентрации Фк в ветвях цистозир в зависимости от светового потока (рисунки 3.11, 3.12). Для проб, взятых в районе Фороса, отмечены разные пики полученных функций: у *C. barbata* наблюдается максимум концентрации Фк при энергии светопотока $63,37 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$. Для *C. crinita* такой максимум не отмечен. Однако отсутствие данного максимума, возможно, связано с внутренней ошибкой используемых методов анализа.

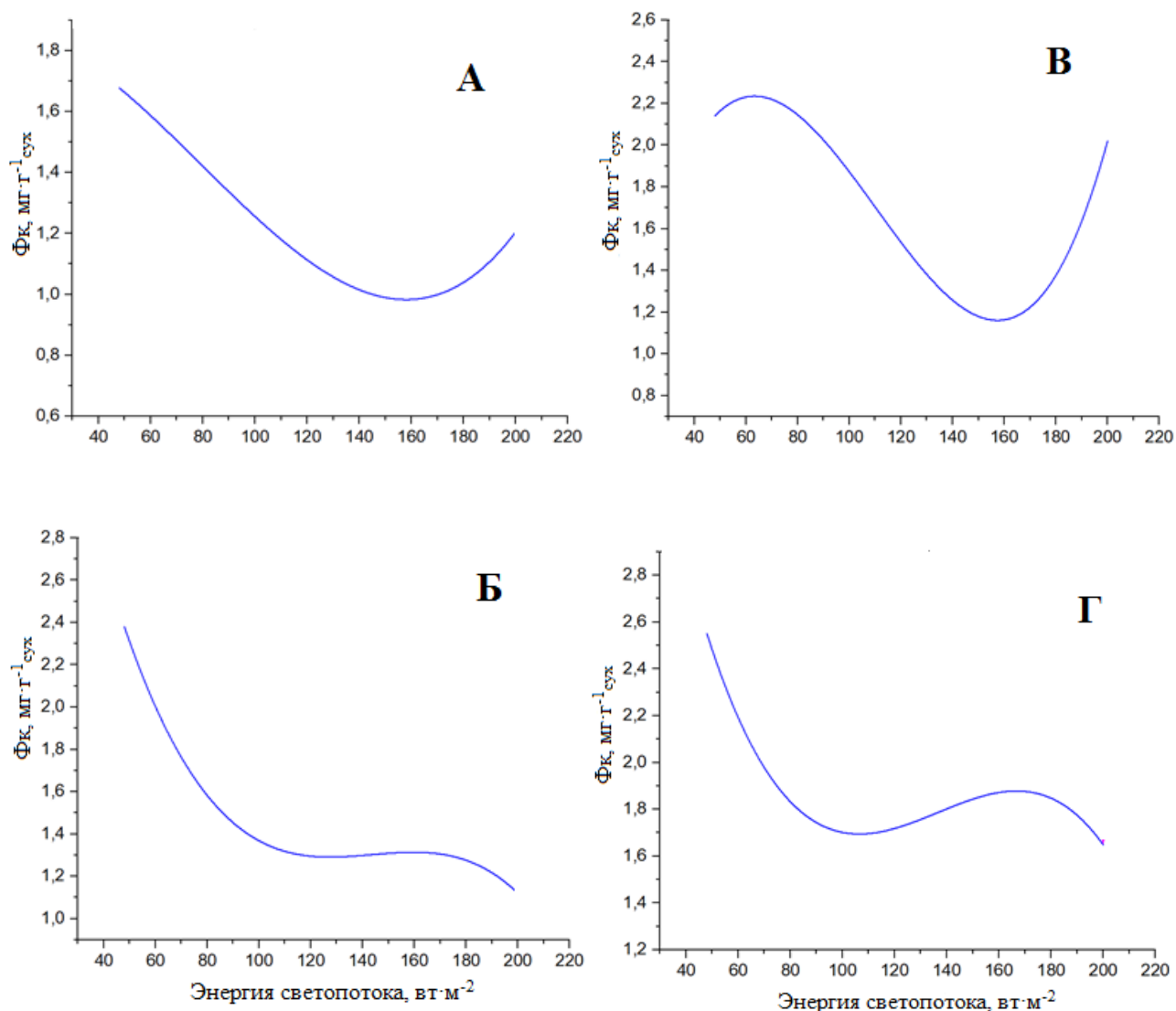


Рисунок 3.11 – Модельные зависимости, построенные для *C. crinita* (А, Б) и *C. barbata* (В, Г) из акваторий Фороса (А, В) и Карантинной бухты (Б, Г)

Как видно из Рисунка 3.11, функциональные зависимости имеют диверсифицированный характер. При сравнении с исходными данными, в ряде случаев отсутствуют максимумы значений концентрации Фк. Для уточнения функциональных зависимостей использован алгоритм сглаживания графической зависимости, использующий разложение в ряд Фурье (FFT), позволяющий сгладить узкие высокие пики в моделируемых функциях. На основе сглаженных функций промоделированы соответствующие зависимости, описывающие динамику концентрации Фк в исследуемых водорослях (Рисунок 3.12).

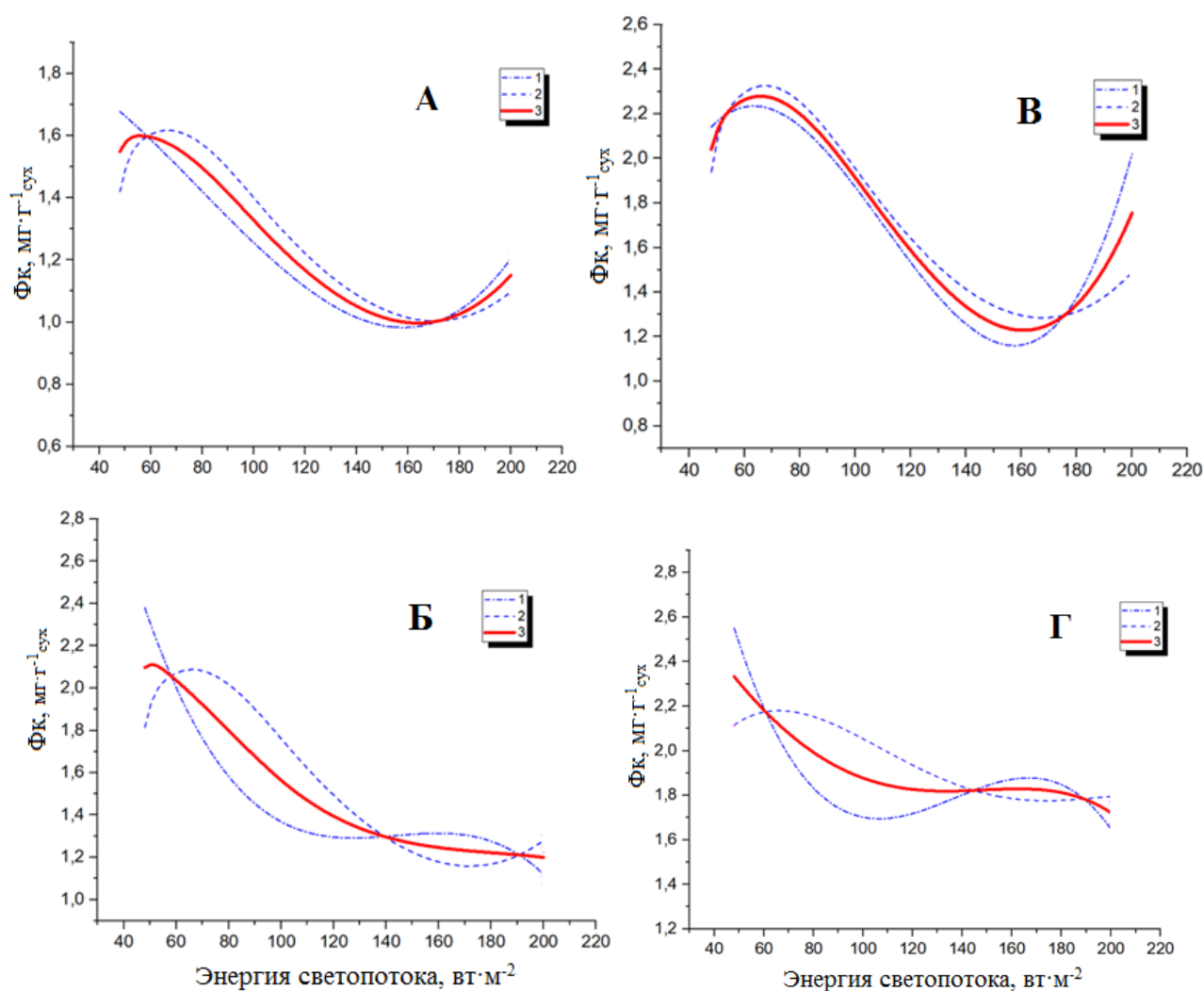


Рисунок 3.12 – Полиномиальная интерполяция ряда сглаженных данных: по Савицкому-Голею (1), методом быстрого преобразования Фурье (2), усреднённая функция (3) для показателей концентрации фукоксантина в бурых водорослях *Cystoseira crinita* (А, С) и *C. barbata* (В, Г) в зависимости от уровня освещённости. А, В – макрофиты из акватории Фороса; Б, Г – из Карантинной бухты

Применение смешанного алгоритма генерации функциональных зависимостей привело к выявлению функционального разделения. Так, для концентраций Фк в водорослях из акватории Фороса характерно наличие двух выраженных экстремумов с большим разделением по оси x (Рисунок 3.12 А, В). В случае с пробами *C. crinita* и *C. barbata*, отобранными в Карантинной бухте, наблюдается сглаживание экстремумов функции (Рисунок 3.12 Б, Г). Анализ

усреднённых зависимостей показал, что лучшей воспроизводимостью обладает биквадратная зависимость, которая позволяет охватить максимумы функций, сглаживаемые при построении кубической зависимости. В итоге, все рассматриваемые зависимости приобрели вид биквадратного уравнения:

$$y=a+b_1x+b_2x^2+b_3x^3+b_4x^4 \quad (3.3)$$

Параметры уравнения приведены в Таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Значения коэффициентов уравнения 3.3. а – варьируемая константа, b_1 - b_3 – коэффициенты поправки функции, r^2 – коэффициент детерминации

Коэффициент	Акватория Фороса			
	<i>C. crinita</i>		<i>C. barbata</i>	
	значение	ошибка	значение	ошибка
a	0,55	0,01	-1,01	0,02
b ₁	0,04	3,82·10 ⁻⁴	0,12	7,21·10 ⁻⁴
b ₂	-6,32·10 ⁻⁴	5,11·10 ⁻⁶	-0,001	9,65·10 ⁻⁶
b ₃	3,04·10 ⁻⁶	2,88·10 ⁻⁸	6,49·10 ⁻⁶	5,42·10 ⁻⁸
b ₄	-4,71·10 ⁻⁹	5,78·10 ⁻¹¹	-8,68·10 ⁻⁹	1,09·10 ⁻¹⁰
r ²	0,99		0,99	
	Карантинная бухта			
a	1,91	0,01	3,15	3,26·10 ⁻¹⁵
b ₁	0,02	5,44·10 ⁻⁴	-0,02	1,24·10 ⁻¹⁶
b ₂	-5,43·10 ⁻⁴	7,28·10 ⁻⁶	2,31·10 ⁻⁵	1,66·10 ⁻¹⁸
b ₃	3,39·10 ⁻⁶	4,09·10 ⁻⁸	7,03·10 ⁻⁷	9,32·10 ⁻²¹
b ₄	-6,79·10 ⁻⁹	8,23·10 ⁻¹¹	-2,54·10 ⁻⁹	1,87·10 ⁻²³
r ²	0,99		0,99	

Инкременты промоделированных функций демонстрируют наличие дополнительных параметров, соответствующих внешним условиям, изменяющим характер графической зависимости. Привязка данных коэффициентов к внешним

условиям поможет установить их фундаментальную роль в процессах генерации Фк в бурых водорослях, что, в свою очередь, актуально для моделирования биотехнологических процессов.

Известно, что аккумуляция Фк в бурых водорослях является одним из способов поддержания нативной жизнедеятельности макрофита в стрессовых условиях [126]. Так, содержание Фк, хлорофиллов *a* и *c* в спорофитах *U. pinnatifida* выше в зимний и весенний период, по сравнению с летним, как для молодых, так и для старых спорофитов [95, 96]. В *Cystoseira hakodatensis* и *Sargassum confusum* концентрация Фк имеет максимальные значения также в январе и марте при минимальной освещенности и температуре воды [272].

В многолетних исследованиях М.В. Макарова [29] показано, что фотосинтетический аппарат бурых водорослей Баренцева моря адаптируется к интенсивности и спектральному составу освещения. Размер ксантосомы зависит от изменения интенсивности освещения, однако адаптация происходит, в основном, за счет снижения или увеличения общего содержания фотосинтетических пигментов. При этом происходят сезонные изменения фотосинтетического аппарата: в осенне-зимний (ноябрь–декабрь) и весенний (март–апрель) периоды происходит накопление фотосинтетических пигментов и увеличение размеров ксантосом. Осенью это связано с адаптацией фотосинтетического аппарата к низкой интенсивности освещения, а весной – с необходимостью энергетического обеспечения процессов интенсивного роста.

Вероятно, фукоксантин у бурых водорослей обладает не только функцией улавливания света, но и действует как сильный фотопротектор. Так как высокое световое воздействие, наряду с большой концентрацией кислорода, приводит к образованию свободных радикалов и окислительному стрессу, бурые водоросли выработали механизмы защиты путем образования основных антиоксидантных соединений [226].

Заключение. Установлено, что у бурых водорослей рода *Cystoseira* максимальная концентрация фукоксантина обнаружена в ветвях возрастной группы от 2 до 3 мес. Содержание пигмента в стволах значительно ниже, чем в ветвях. На протяжении всего периода наблюдений, независимо от места отбора проб, содержание Фк в ветвях *C. barbata* выше, чем в *C. crinita*. Вероятно, это связано с тем, что *C. barbata* обитает в относительно закрытых участках моря и бухтах. Концентрация Фк в ветвях обоих видов цистозир из относительно загрязненной акватории Карантинной бухты выше, чем концентрация пигмента в макрофитах, обитающих в открытой части моря. Годовая динамика содержания Фк у цистозир имеет хорошо выраженные периоды максимума и минимума. Пик концентрации Фк приходится на осенне-зимний период. Минимальные значения пигмента отмечены в весенне-летний период при максимальной температуре и освещенности. В динамике изменения концентрации Фк у *C. barbata* и *C. crinita* наблюдается синхронное снижение уровня пигмента с ростом интенсивности общего светового потока. Разнонаправленный характер этих пиков может свидетельствовать об отрицательной регуляторной связи интенсивности светопотока и процессом снижения концентрации Фк у бурых водорослей. Моделирование зависимости содержания Фк у бурых водорослей рода *Cystoseira* от интенсивности общего светового потока с помощью полиномиальной аппроксимации позволило установить, что данный процесс хорошо описывается биквадратным уравнением с высоким коэффициентом детерминации.

ГЛАВА 4 КОНЦЕНТРАЦИЯ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ В БУРЫХ ВОДОРОСЛЯХ РОДА *CYSTOSEIRA* ИЗ АКВАТОРИЙ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Известно, что растения содержат фермент антиоксидантной защиты супероксиддисмутазу (SOD) для улавливания активных форм кислорода (ROS) [149]. SOD растений содержит медь и цинк (CuZnSOD) в межмембранном пространстве митохондрии и других частях клетки, а в некоторых случаях – железо (в хлоропластах), в дополнение к CuZnSOD. Это фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий дисмутацию радикалов O_2^- и препятствующий превращению супероксидного анион-радикала в гидроксильный радикал, обладающего высокой токсичностью. Он служит акцептором свободных кислородных радикалов, тормозящим перекисное окисление липидов и белков. Таким образом, растения, в т.ч. и водоросли, накапливают микроэлементы (такие как Zn и Cu) для обеспечения жизненно-важных функций в небольших концентрациях, которые не оказывают токсического эффекта на организм. С другой стороны, в макрофитах накапливаются тяжелые металлы (например, Pb и Cd), которые даже в небольших количествах оказывают негативное воздействие на растение. Поэтому в работе основное внимание уделено изучению этих тяжелых металлов.

4.1 Содержание тяжелых металлов в разновозрастных ветвях *Cystoseira barbata*

Рассмотрим варьирование концентрации тяжелых металлов (Zn, Cu, Pb, Cd) в разновозрастных ветвях бурых водорослей на примере *C. barbata*. Для этого выделили 5 возрастных групп ветвей макрофита: до 1,9 мес., от 2 до 3 мес., от 3 до 5 мес., от 5 до 6 мес., более 6 мес. (рисунки 4.1 и 4.2).

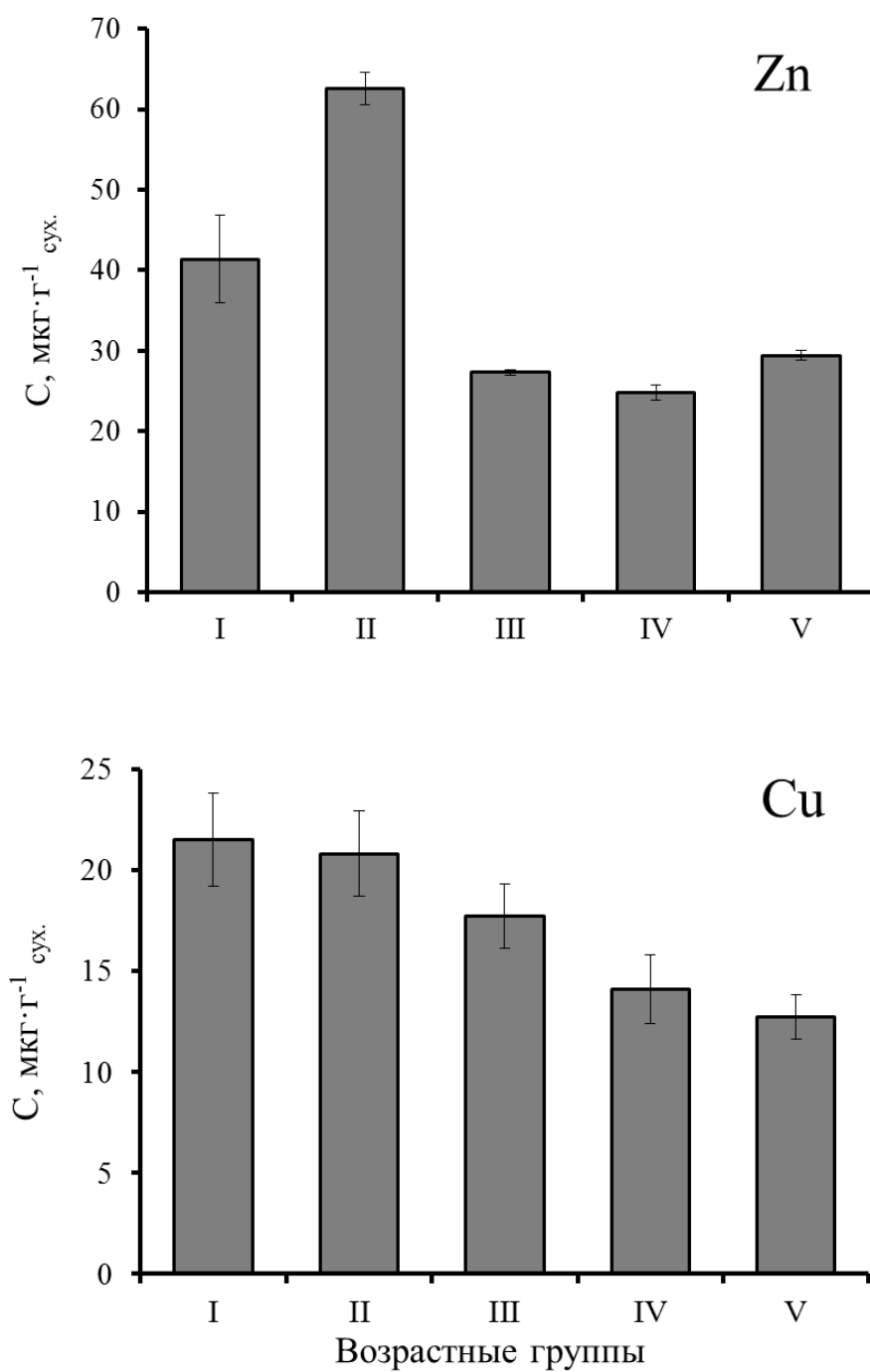


Рисунок 4.1 – Концентрация (C) цинка и меди в ветвях *Cystoseira barbata* первого порядка. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

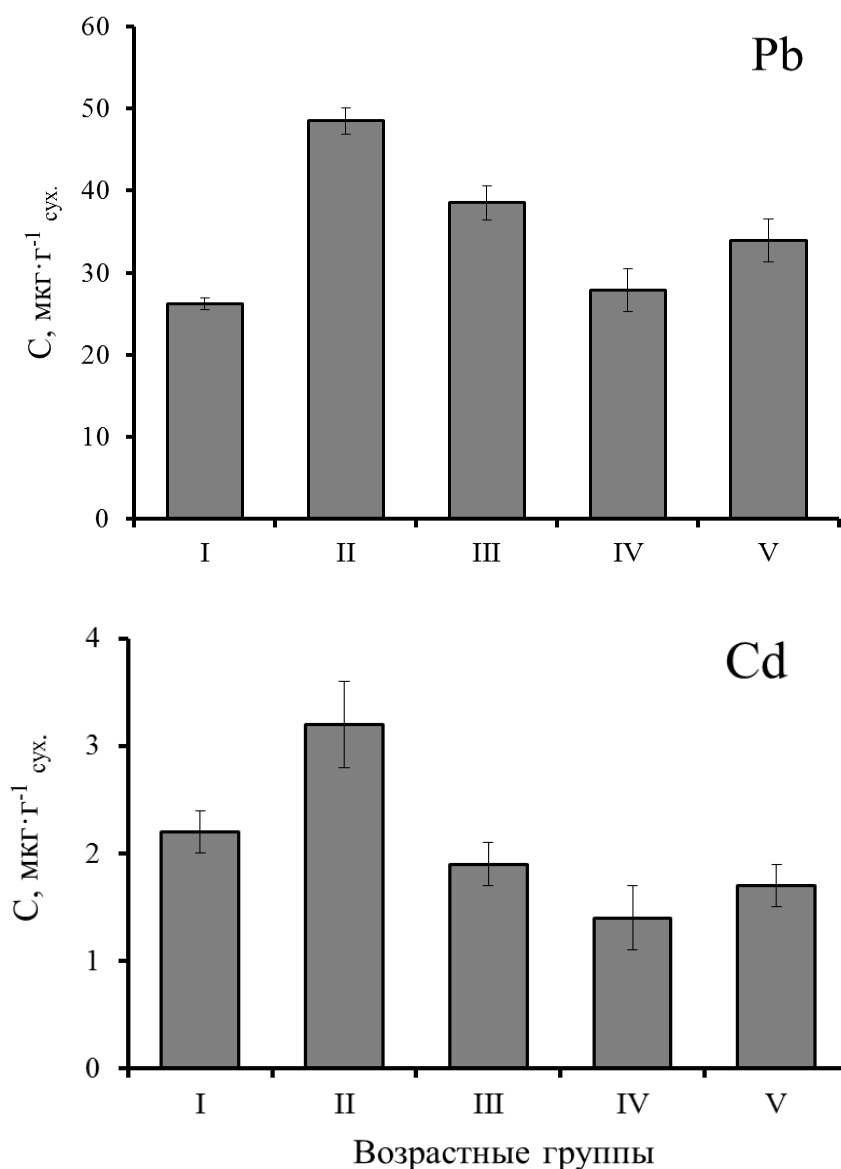


Рисунок 4.2 – Концентрации (C) свинца и кадмия в ветвях *Cystoseira barbata* первого порядка. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

Содержание тяжелых металлов значительно выше ($p < 0,05$) в ветвях возрастом от 2 до 3 мес. Максимальные концентрации цинка, свинца и кадмия в ветвях данной возрастной группы составили $62,6 \pm 2,0$; $48,5 \pm 1,6$ и $3,2 \pm 0,4$ $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1} \text{сух.}$, соответственно. Содержание металлов в ветвях *C. barbata* от 3 до 6 мес. и старше остается относительно постоянным, за исключением меди. Содержание

Cu с возрастом ветви снижается, причем концентрации меди в ветвях первой и второй возрастных групп имеют сходные значения.

Характер онтогенетических изменений содержания металлов и интенсивности фотосинтеза у цистозеры во многом совпадают [46, 56]. Во всех случаях наблюдается одновершинная зависимость названных параметров у ветвей с максимумом в возрастном диапазоне от 2 до 3 месяцев. Морфологическая структура ветвей этого возраста считается полностью сформированной [45], в структуре ветви представлены все порядки ветвления, удельная поверхность ветви достигает своего максимума. В осевой структуре ветвей в возрасте до 2 мес. доминирующее положение по массе занимают структуры первого порядка, обладающие невысокой удельной поверхностью и интенсивностью фотосинтеза. Ветви этого же возраста содержат относительно низкие концентрации тяжелых металлов.

С четырехмесячного возраста начинается разрушение морфологических структур ветвей, и, в первую очередь, происходит опадение осей высших порядков ветвления [45]. Доля осевых структур низших порядков, обладающих невысокой интенсивностью фотосинтеза, увеличивается. Это может быть, возможно, одним из объяснений снижения содержания тяжелых металлов в ветвях старше четырех месяцев.

Наблюдаемые относительно высокие значения содержания цинка в ветвях цистозеры в возрасте от 2 до 3 мес., возможно, можно объяснить возрастанием активности белков, содержащих домен «цинковый палец» [189]. Эти белки участвуют в процессе транскрипции и трансляции ДНК, транспорте РНК, формировании третичной структуры белков, создании цитоскелета и ремоделировании хроматина. Цинк в данных белках играет роль катализатора активности. Накопление цинка в полисахаридах обусловлено его наличием в лиазах, ферментах, образующих комплексы с полисахаридами, и также включающих в свою структуру домен «цинковый палец».

Биологическая роль накопления свинца в ветвях макрофитов неизвестна. Но, как показали наблюдения, при концентрации Pb в среде до $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$

фотоустойчивость хлорофилла увеличивается, что видно по удлинению латентного периода. Увеличение концентрации свинца до $5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ приводит к сокращению латентного периода, который при $10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ полностью исчезает. Повышение фотоустойчивости растения при относительно низких концентрациях Pb связано, вероятно, с влиянием этого элемента на пигмент-белковые комплексы или с временной стимуляцией репарационных процессов в пигментном аппарате.

Исследования по биоремедиации воды, загрязненной свинцом, показали, что бурые водоросли, например, *Fucus vesiculosus*, способны аккумулировать значительное количество Pb, и, следовательно, сильно снижать его концентрацию в воде [156]. При этом, относительно низкие концентрации свинца в среде (50 и $100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) практически не влияют на рост макрофита. При более высоких концентрациях Pb (200 и $1000 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) наблюдается сильное подавление роста водоросли, с уменьшением примерно на 70% по сравнению с эталонным образцом. Снижение уровня свинца в растворе авторы объясняют взаимодействием металл-водоросль (например, сорбция металла на клеточных стенках водорослей), поскольку данные в контроле показывают, что концентрация металла в воде с течением времени не меняется, что исключает выпадение свинца в виде осадков. Поглощение свинца макроводорослями происходит быстрее в начале эксперимента, замедляясь со временем. Значительное снижение концентрации металла в растворе в начале эксперимента объясняется пассивным поглощением (биосорбцией), когда металл связывается с поверхностью водорослей (первоначально без металла) путем поверхностного комплексообразования, осаждения, физической адсорбции или ионного обмена [70, 101].

В дальнейшем биосорбция и внутриклеточное накопление через белки, богатые тиольными группами, например металлотионеины, проходит одновременно [70, 101, 155, 213]. По мере того, как происходит биоаккумуляция, концентрация металла в биомассе водорослей будет возрастать, а концентрация металла в растворе уменьшится, что приведет к непрерывному уменьшению извлечения металла из раствора. Однако при клеточном росте происходит образование новых центров связывания, и теоретически равновесная стадия не

может быть достигнута. Эти исследования подтверждают возможность применения бурых водорослей как индикаторов загрязнения вод тяжелыми металлами ввиду их длительного онтогенеза и прикрепленного образа жизни.

Кадмий является токсичным микроэлементом практически для всех живых объектов. Он может активно включаться в биохимические процессы. Так, ионы Cd способны заменять цинк и железо, вытесняя его из белков. Таким образом, нарушаются функции белков, содержащих домен «цинковый палец», что ведёт к угнетению процессов деления клеток и роста водорослей. Вытеснение железа приводит к нарушению работы белкового комплекса цитохром С-оксидазы, вызывая тем самым оксидативный стресс. Кадмий вызывает замещение ионов магния в хлорофилле и, тем самым, снижает светособирающую способность растений [261]. Объяснить причины, почему этот элемент накапливается больше всего в ветвях цистозеры *C. barbata* в возрасте от 2 до 3 месяцев, пока не представляется возможным.

С другой стороны показано, что активность фотосинтеза бурой водоросли *Sargassum cymosum* под влиянием Cd сильно не изменяется [108]. Анализ скорости переноса электронов не показал фотоингибирования, вызванного обработкой кадмием, и никаких существенных различий в результатах квантового выхода фотосинтеза не наблюдали. Другие авторы сообщают об уменьшении скорости переноса электронов и более низких значениях квантового выхода фотосинтеза при воздействии Cd на водоросли [118, 229].

Результаты работы [108] показали, что фотоакклимация у водорослей происходит благодаря отсутствию изменений в хлоропластах, что удалось установить с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, и синтезу пигмент-белковых комплексов, способных индуцировать снижение фотосинтетической активности. Экспериментальное воздействие кадмия на бурые водоросли *Sargassum cymosum* привело к значительному увеличению содержания хлорофиллов, необходимых для поддержания активности фотосинтеза и путей синтеза пигментов.

Увеличение концентрации каротиноидов в растении может быть связано с важными физиологическими ответами. Во-первых, в качестве вспомогательных пигментов фотосинтеза каротиноиды поглощают фотосинтетически активную радиацию (ФАР), а вместе с высокими уровнями хлорофилла они могут поддерживать фотосинтетическую активность [74]. Другая биохимическая роль каротиноидов связана с антиоксидантной защитой. Каротиноиды, соединения с низкой молекулярной массой, действуют как антиоксидантная защита против ROS из пероксидов, деградации органелл и других токсичных соединений [74, 233]. Однако вариации в содержании каротиноидов показали [108], что некоторые классы каротиноидов могут быть более тесно связаны с антиоксидантным ответом, чем другие. Так, в конце эксперимента при различных концентрациях Cd в бурых водорослях сильно уменьшалось содержание лютеина, тогда как доля фукоксантина и β -каротина возрастала, что, вероятно, связано с деградацией лютеина при антиоксидантном ответе и поддержанием синтеза фукоксантина. Также показано, что Cd не оказывает негативного воздействия на фотосинтетические пигменты и даже при длительном воздействии кадмия на водоросль поддерживается синтез хлорофилла а и с.

Кадмий в меньшей степени влияет на фотосинтез, чем другие металлы (Cu, Zn и Cr) [76]. Авторы также обнаружили, что Cd способен заменять ион Mg^{2+} в молекуле хлорофилла, но этот эффект реже возникает у бурых водорослей по сравнению с другими видами. Кадмий приводит к снижению роста бурой водоросли *Fucus vesiculosus* на 20 % по сравнению с контролем, где макроводоросль росла в условиях отсутствия Cd в среде [156]. Более высокая концентрация Cd в воде ($200 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$) угнетала рост уже на 42 %. Количество Cd, накапливаемое бурыми водорослями при концентрации в воде $200 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, в 2-7 раз выше, чем зарегистрировано при более низких концентрациях (10, 50 и $100 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$). Также следует отметить, что рост бурых водорослей в среде с одновременным присутствием кадмия, ртути и свинца существенно не меняется, даже в условиях сильного загрязнения металлами. По данным исследований тех же

авторов установлено, что биоаккумуляция металлов бурыми водорослями проходит необратимо.

Анализ баланса массы между начальным содержанием металла (кадмия, свинца и ртути) в воде и его концентрацией после пребывания в растворе с бурой водорослью *F. vesiculosus* в течение 7 дней показал [156], что весь металл, удаленный из морской воды, связан макрофитом. Для всего спектра концентраций металлов в воде (50, 100 и 200 мкг·л⁻¹) экспериментальные и теоретические значения концентраций металлов в водорослях практически совпадают (максимальная относительная погрешность 7,9 % для свинца, концентрация металла в растворе 1000 мкг·л⁻¹). Таким образом, хорошее соответствие концентрации металлов в макрофитах теоретическим представлениям подтверждают, что бурые водоросли являются биоиндикаторами загрязнения окружающей среды [279]. Способность бурых водорослей концентрировать металлы в тканях может позволить оценить содержание этих металлов в природных водах при очень низких концентрациях, когда их определение аналитическими методами затруднено.

Ранее исследовали содержание Zn, Cu и Pb в разных частях слоевища *S. crinita* возрастом 10 лет [23]. Талломы водорослей были поделены на четыре части - ствол, короткие, средние и длинные ветви. Показано, что концентрация цинка убывает в ветвях цистозир по мере старения ветвей. В молодых ветвях концентрация Zn в 1,7 раза больше, чем в старых. Концентрация Cu в стволах и неразрушающихся ветвях примерно одинакова, а в старых ветвях её в 2 раза меньше. В старых ветвях концентрация Pb в несколько раз выше, чем в других частях растения. Эти данные согласуются с нашими результатами по Zn и Cu, однако обнаружена обратная зависимость по содержанию Pb. Стоит отметить, что мы проводили исследования на другом виде цистозир – *C. barbata*.

4.2 Годовая динамика содержания тяжёлых металлов в цистозирах

Биоаккумуляция металлов растениями зависит от времени года, так как сезонные изменения в росте влияют на особенность накопления металла. Ветви цистозирей возрастной группы 2-3 мес. наиболее активно накапливают ТМ, поэтому на их примере рассмотрим годовую динамику содержания некоторых элементов. Концентрацию металлов изучали у цистозирей, собранных в акватории Фороса и Карантинной бухте (Рисунок 4.3). Средние значения содержания тяжелых металлов в обоих видах цистозирей можно представить в виде убывающего ряда: $Zn > Pb > Cu > Cd$.

В наибольшем количестве из исследуемых металлов в тканях водорослей накапливается цинк, элемент, важный в клеточном метаболизме [204]. Для обоих видов цистозирей максимальное содержание цинка отмечено в зимний и осенний периоды. Максимальная концентрация Zn в ветвях *C. barbata* найдена в январе и ноябре ($35,6 \pm 9,9$ мкг·г⁻¹_{сух} и $31,0 \pm 13,5$ мкг·г⁻¹_{сух}).

Максимальная концентрация свинца в ветвях *C. barbata* получена в феврале ($28,5 \pm 0,5$ мкг·г⁻¹_{сух}) и мае ($33,4 \pm 4,5$ мкг·г⁻¹_{сух}). Аналогичная картина была отмечена для *C. crinita*, где максимальная концентрация металла была зафиксирована в феврале ($28,0 \pm 0,1$ мкг·г⁻¹_{сух}) и мае ($30,5 \pm 1,5$ мкг·г⁻¹_{сух}).

Концентрация меди у обоих видов достигает максимума в весенне-летний период, что совпадает с периодом интенсивного роста ветвей цистозирей, сопровождаемого интенсификацией процессов фотосинтеза [18, 258]. В ветвях *C. barbata* максимум отмечен в июле ($8,3 \pm 2,1$ мкг·г⁻¹_{сух}), у *C. crinita* – в июне ($7,5 \pm 0,2$ мкг·г⁻¹_{сух}).

Изменения концентраций цинка, свинца и меди в ветвях цистозирей имеют разную сезонную динамику, а их отклики характеризуются мультимодальностью. Наблюдается противофазность в изменении концентраций Zn и Pb с хорошо выраженной амплитудой колебания. Ширина амплитуд колебаний концентраций металлов снижается в ряду: $Pb > Zn > Cu$. Концентрация Cu в ветвях обоих видов водорослей заметно ниже, чем Pb и Zn .

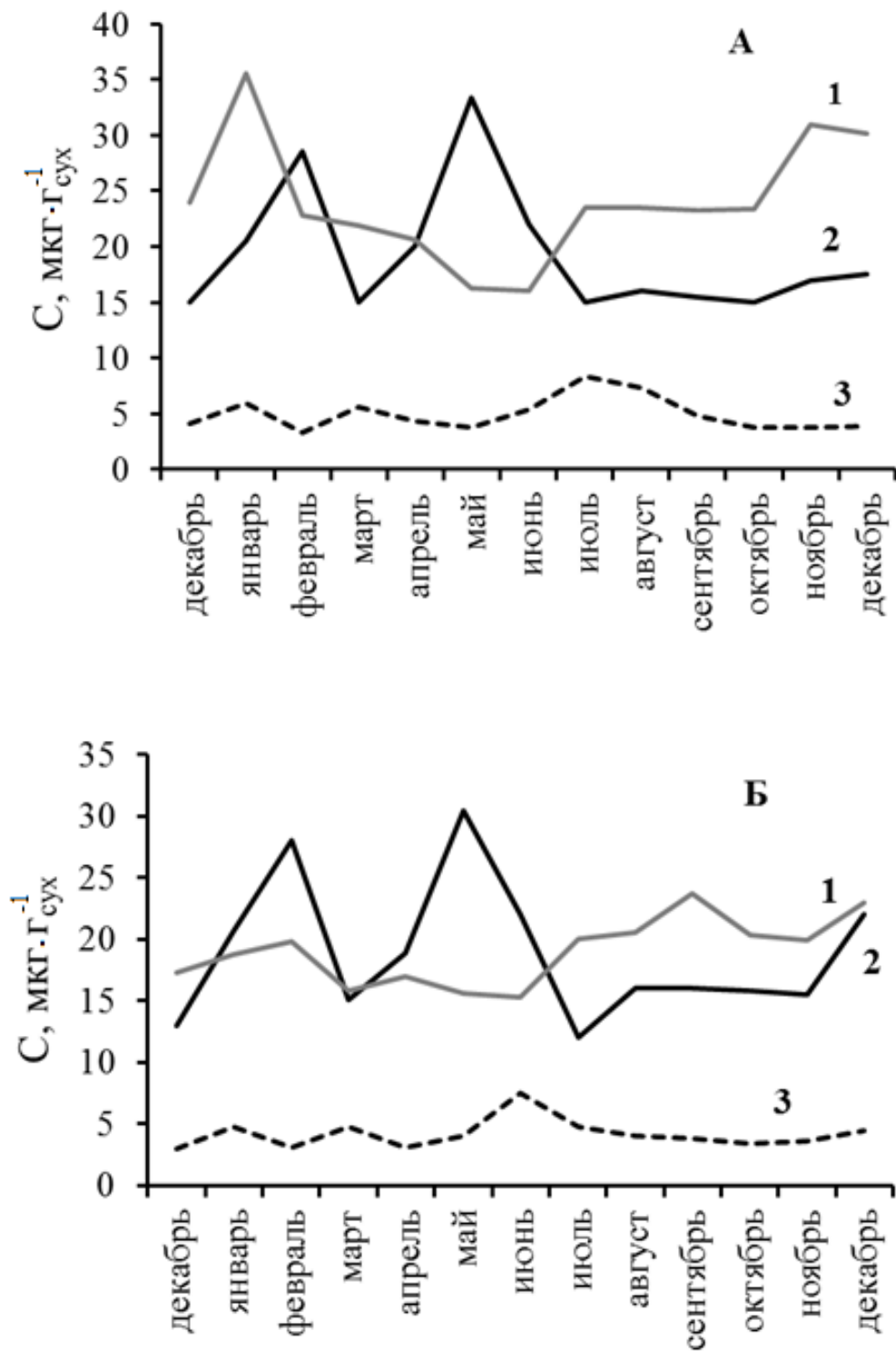


Рисунок 4.3 – Средние концентрации (С) цинка (1), свинца (2) и меди (3) в *Cystoseira barbata* (А) и *C. crinita* (Б) из акватории Фороса и Карантинной бухты

Наибольшие концентрации Zn в цистозирах совпадают с периодом размножения водоросли и, скорее всего, связаны с повышением активности белков,

включающих домен «цинковый палец». Известно, что в период активного роста наблюдается накопление цинка, что связано, в первую очередь, с экспрессией и активацией белков, содержащих этот домен [103, 189].

Противофаза в изменении концентраций свинца и цинка характерна для обоих видов цистозир (Рисунок 4.3). Данное явление можно объяснить тем, что эти металлы являются биологическими антагонистами. Таким образом, избыточная концентрация Zn приводит к общему снижению уровня Pb в клетках за счёт его связывания и выведения из пула живых клеток. В фазе угнетения роста водорослей всё происходит наоборот. Противофазу в изменении уровней Zn и Pb в тканях бурых водорослей можно трактовать как форму ответа, стимулирующего связывание и удаление свинца из пула делящихся клеток с целью повышения стабильности процессов их деления.

При исследовании биоиндикаторной роли *C. barbata* в мониторинге загрязнения прибрежных акваторий Чёрного моря (в бухтах г. Севастополя) тяжёлыми металлами (Zn, Cu, Pb, Cd) показано, что содержание меди и цинка в структурных разновозрастных элементах цистозиры имеет наибольшие значения зимой, наименьшие – летом. Для Pb была отмечена обратная зависимость, когда пик концентрации был выявлен в летне-осенний период [55]. В нашем исследовании концентрация Zn была наибольшая также в зимний период, однако пики концентраций Pb и Cu не совпадают с данными автора.

Ежемесячные исследования содержания тяжелых металлов в *C. barbata*, собранной на 5 станциях с различными степенями загрязнения в прибрежной зоне восточной части Эгейского моря (Турция), были выполнены в 2002-2003 году [73]. На всех станциях концентрации меди и цинка в цистозире имели сходные значения с нашими данными. Причем максимальная концентрация меди в водорослях на всех станциях была отмечена в августе или сентябре, цинка – в январе-феврале и сентябре-октябре.

4.2.1 Сезонная динамика содержания тяжёлых металлов в стволах цистозир

В связи с тем, что стволы цистозир имеют большую продолжительность жизни, чем ветви, рассмотрим сезонную динамику концентрации металлов в талломах макрофитов возрастом 3,3-5 лет (длина 9-14 см) (рисунки 4.4 и 4.5). Концентрация меди и свинца в стволах цистозир в течение года изменялась незначительно. Максимальная концентрация Cu в стволах *C. barbata* из Карантинной бухты зафиксирована в ноябре и составила $5,8 \pm 0,2 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, в *C. crinita* в январе – $7,3 \pm 0,3 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. На станции у Фороса максимальный пик концентрации Cu обнаружен для обоих видов цистозир в декабре: в *C. barbata* – $6,4 \pm 0,4 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, и в *C. crinita* – $7,8 \pm 0,3 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. В стволах цистозир пик концентрации Pb отмечен в зимний период для обоих мест произрастания. В стволах *C. barbata* из акватории Карантинной бухты максимум составил $20,9 \pm 0,8 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, у *C. crinita* – $23,5 \pm 0,3 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, из Фороса для *C. barbata* – $22,0 \pm 0,8 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ и для *C. crinita* – $20,0 \pm 0,7 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$.

Концентрация цинка в стволах *C. barbata* из Карантинной бухты имела максимальные значения в осенний период – $32,1 \pm 1,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, в *C. crinita* в зимний период – $74,3 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. На станции у Фороса содержание Zn в стволах *C. barbata* – $34,0 \pm 0,5 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, в *C. crinita* – $55,2 \pm 1,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ было максимальным в зимний период. Среднегодовое значение концентрации Zn в стволах цистозир из Карантинной бухты составило $62,2 \pm 12,3 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ и $26,4 \pm 4,2 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ соответственно. В стволах *C. crinita* и *C. barbata* из Фороса – $47,6 \pm 6,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ и $25,5 \pm 6,9 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. Из полученных данных видно, что концентрация Zn в стволах *C. crinita* в 2 раза выше, чем в *C. barbata*. Также следует отметить, что содержание Zn в *C. crinita* из акватории Карантинной бухты в 1,5 раза выше, чем из Фороса. В целом, концентрация Zn в стволах *C. crinita* превышала в 2-3 раза содержание в ветвях, данная закономерность не обнаружена для *C. barbata*.

Полученные концентрации согласуются с данными [52], однако содержание свинца в цистозирах из прибрежных акваторий Новороссийской бухты значительно ниже, чем для макрофитов Севастополя.

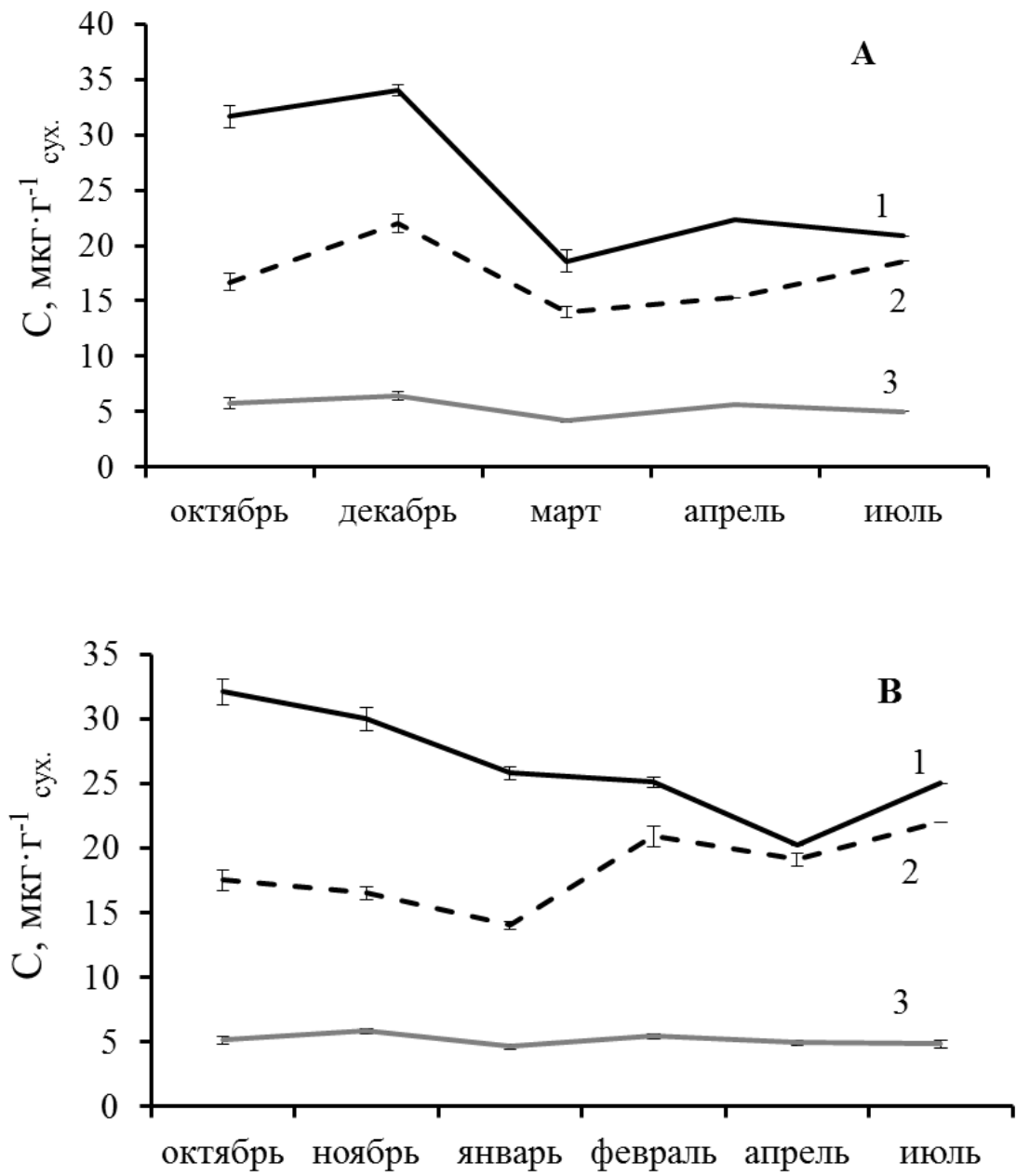


Рисунок 4.4 – Концентрация Zn (1), Pb (2), Cu (3) в стволах *C. barbata* возраста 3,3-5 лет из акватории Фороса (А) и Карантинной бухты (В)

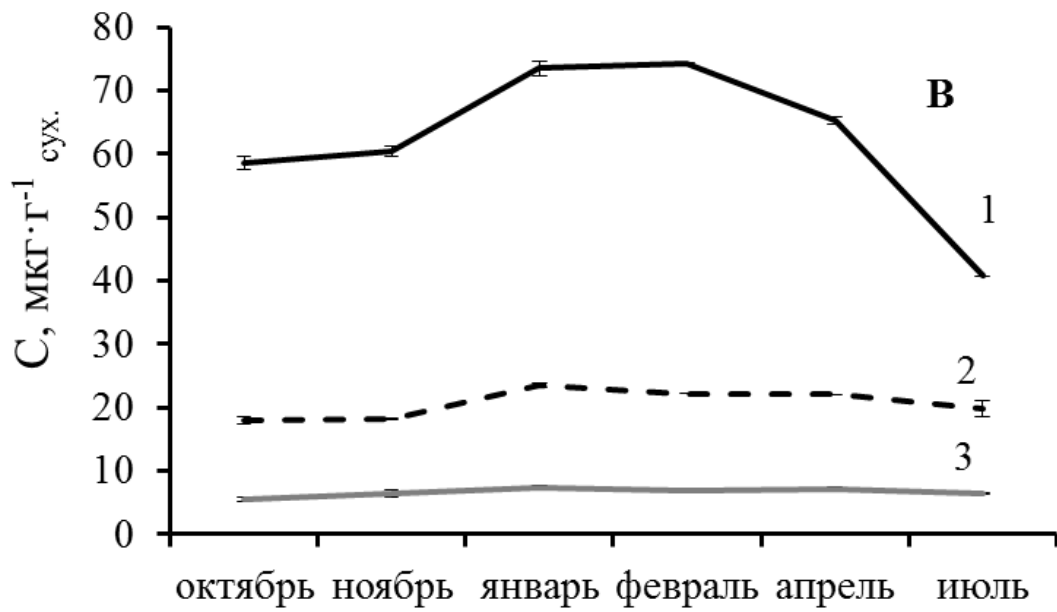
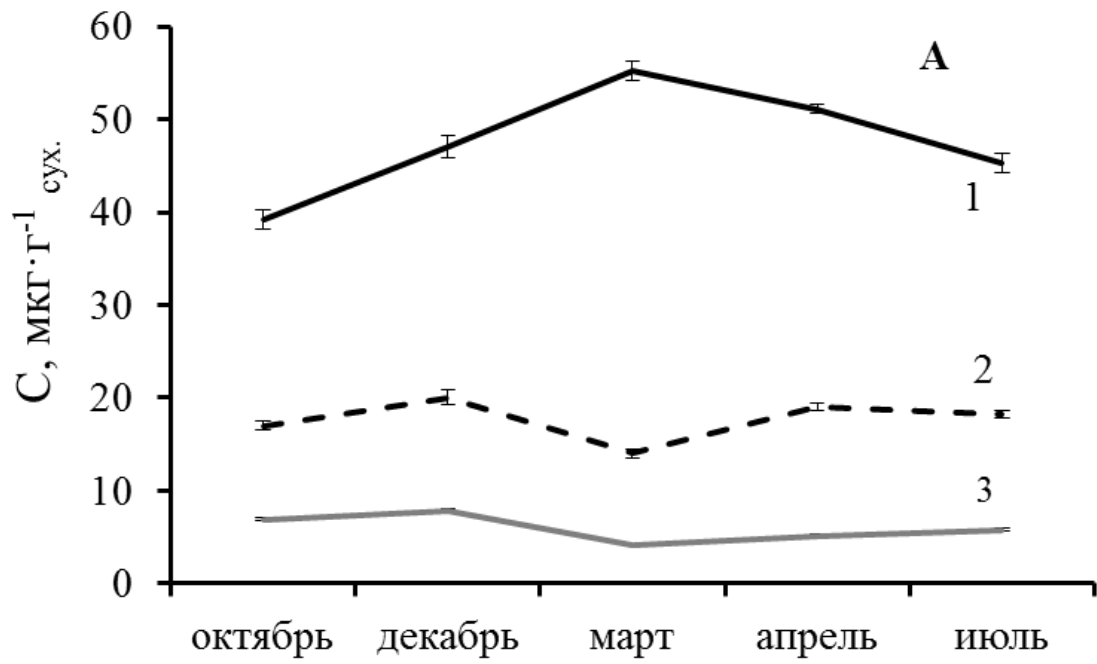


Рисунок 4.5 – Концентрация Zn (1), Pb (2), Cu (3) в стволах *C. crinita* возраста 3,3-5 лет из акватории Фороса (А) и Карантинной бухты (В) (2013-2014 гг.)

4.3 Содержание тяжёлых металлов в *C. barbata* и *C. crinita* из акваторий с разным антропогенным уровнем

Содержание некоторых тяжелых металлов в грунтах может характеризовать уровень антропогенной нагрузки на акваторию. Концентрации Cu и Zn в донных отложениях Карантинной бухты в два раза выше, чем в Форосе (Таблица 4.1). Концентрации Cd и Pb статистически достоверно не различались. Полученные данные показывают, что Карантинная бухта испытывает повышенную антропогенную нагрузку.

Таблица 4.1 - Концентрация металлов в донных осадках

Акватория	Концентрация металлов, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$			
	Cu	Zn	Cd	Pb
Карантинная бухта	$19,0 \pm 3,0$	$65,0 \pm 9,0$	$8 \pm 2,0$	$27 \pm 4,0$
Форос	$9,0 \pm 1,5$	$37 \pm 5,5$	$8 \pm 2,0$	$25 \pm 3,5$

В ветвях обоих видов цистозир, взятых из Карантинной бухты, отмечена повышенная концентрация цинка в течение всего периода исследования (рисунки 4.6 и 4.7). Более высокая концентрация Zn может быть связана как с особенностями вегетации растений, так и с повышенным содержанием Zn в воде в местах отбора проб. Максимальная концентрация Zn в ветвях *C. barbata* из Карантинной бухты отмечена в январе ($45,6 \pm 1,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), минимальная – в Форосе в апреле ($11,8 \pm 0,5 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). Среднегодовое значение концентрации Zn для *C. barbata* из акватории Фороса и Карантинной бухты составило $19,5 \pm 5,4$ и $29,0 \pm 9,3 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, для *C. crinita* из акватории Фороса и Карантинной бухты – $17,1 \pm 4,4$ и $21,6 \pm 2,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ [244].

Водоросли, как правило, легко аккумулируют Zn и Cu из морской воды [159]. В качестве фона для незагрязненных районов предложено принять уровни Zn в макрофитах, не превышающие $100 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ [30]. В наших исследованиях

максимальная концентрация Zn для *C. barbata* из акватории Фороса составила $25,7 \pm 0,2 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, из Карантинной бухты – $45,6 \pm 1,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. Для проб *C. crinita* из Фороса, – $27,8 \pm 0,1 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, из Карантинной бухты – $24,6 \pm 0,8 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$.

Максимальная концентрация свинца у макрофитов из Карантинной бухты зафиксирована в мае: *C. barbata* ($37,9 \pm 1,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), *C. crinita* ($32,0 \pm 1,0 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). Среднегодовые значения концентрации Pb для *C. barbata* из Фороса и Карантинной бухты составили $19,8 \pm 5,4 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ и $18,9 \pm 7,6 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. Для ветвей *C. crinita* из Фороса – $19,2 \pm 6,6 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, из Карантинной бухты – $19,4 \pm 5,9 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. Как видно, средние концентрации свинца из разных мест отбора проб практически совпадают.

Максимальные значения концентрации меди в *C. barbata* из Фороса зафиксированы в июле ($10,4 \pm 0,8 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), в *C. crinita* – в июне ($7,7 \pm 0,1 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). Для *C. barbata* из Карантинной бухты максимальная концентрация Cu составила $8,1 \pm 0,5 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$, для *C. crinita* – $7,4 \pm 0,5 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$. У бурой водоросли *Ascophyllum nodosum* из загрязненных районов норвежских фьордов концентрация Cu составляла 200-300 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ [152]. Низкие концентрации меди в наших исследованиях могут указывать на отсутствие антропогенных источников этого металла в акваториях Фороса и Карантинной бухты.

Водоросли связывают только свободные ионы металлов, концентрации которых зависят от природы взвешенных частиц [283]. Взвесь, в свою очередь, включает как органические, так и неорганические комплексы, что позволяет оценить биологически доступные уровни загрязняющих веществ в экосистеме или воздействие загрязняющих веществ на живые организмы [63]. Таким образом, изменение содержания тяжелых металлов в бурых водорослях отражает характер изменений этих элементов в окружающей среде. Фактически, средние концентрации всех измеренных металлов в настоящем исследовании сопоставимы с результатами предыдущих исследований для цистозир из различных регионов Чёрного моря [43, 52, 55, 192].

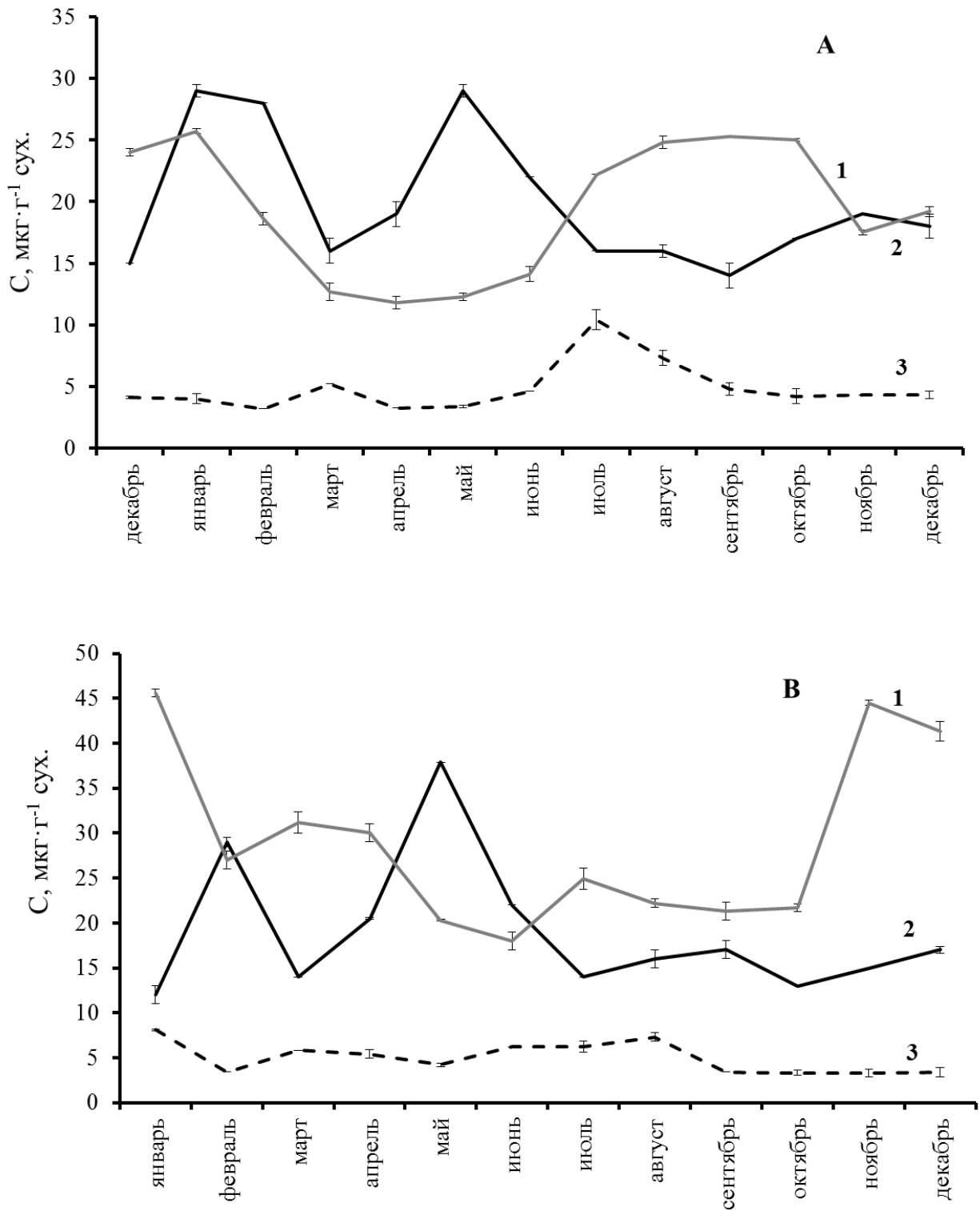


Рисунок 4.6 – Концентрации (С) цинка (1), свинца (2) и меди (3) в 2-3-месячных ветвях *Cystoseira barbata*, собранных в акватории Фороса (А) и Карантинной бухте (В)

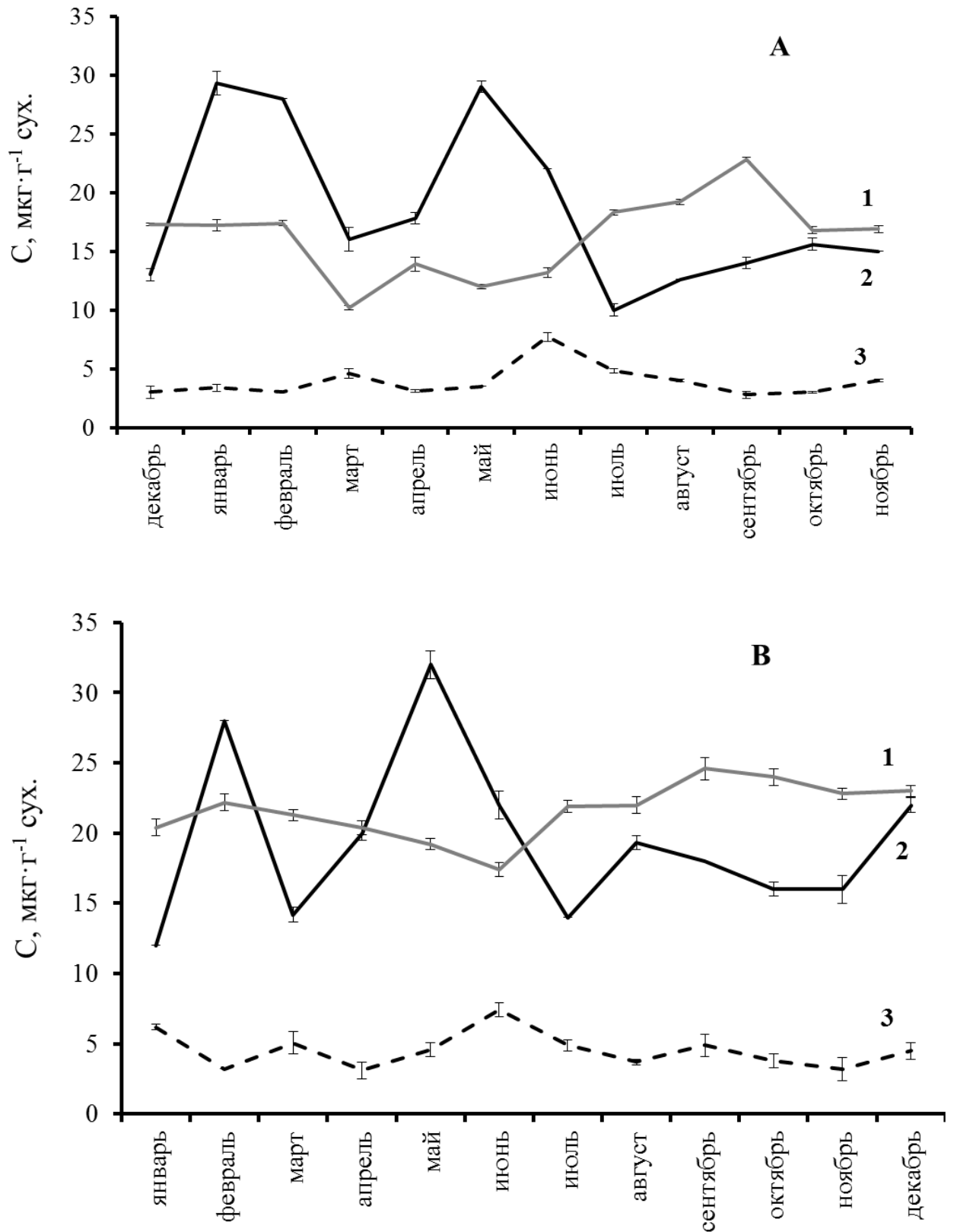


Рисунок 4.7 – Концентрации (С) цинка (1), свинца (2) и меди (3) в 2-3-месячных ветвях *Cystoseira crinita*, собранных в акватории Форос (А) и Карантинной бухте (В)

Исследование содержания токсичных элементов (Cd, Pb, As, Hg) в цистозирах *C. crinita* и *C. barbata* выполнены в разных районах моря (Судакский залив, п. Шепси, Голубая бухта) [43]. Концентрации Pb и Cd на всех станциях отбора проб была ниже данных, полученных нами. Концентрации Pb в макрофитах на разных станциях были схожими, как и в нашем случае. Концентрация Pb в ветвях *C. barbata* из акватории Новороссийской бухты составила $1,5 - 2,1 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ в апреле 2005 г., в *C. crinita* – $0,5 - 1 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$, в июле – $0,6 - 4,4$ и $1,5 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$, соответственно [52].

Для *C. barbata* концентрация Pb в апреле выше в 10 раз, а в июле – в 5 раз, для *C. crinita* – в 18 и 8 раз, соответственно, в сравнении с результатами из Новороссийской бухты. Концентрации Cu имели сходные значения с нашими данными, и, в зависимости от месяца отбора, практически не менялись. Концентрации Zn в цистозирах по нашим данным в апреле были ниже в 4-7 раз, а в июле – в 1,5-55 раза. Также автором [52] выявлена тенденция к снижению содержания Pb, Cu и Zn в ветвях *C. crinita* по направлению от загрязненных участков Новороссийской бухты к условно чистым, а для *C. barbata* такая зависимость обнаружена для свинца и Cu. Для наших данных у обоих видов цистозир подобная зависимость выявлена только для свинца.

Сравнение содержания Cd, Pb, Cu и Zn в *C. barbata*, собранной вблизи турецких городов Синоп, Силе, Рива и Игнеада [145], показало, что концентрация Cu схожа с полученными нами значениями, а содержание Pb, Cu и Zn выше в пробах, отобранных в акватории Севастополя (Таблица 4.2). Концентрация Zn в цистозире из г. Ризе (Турция) значительно превышает полученные нами значения, а содержание Pb в 1,5-2 раза ниже. Аналогичные данные установлены для цистозир из г. Силе, а для проб из г. Синоп концентрация Pb превышала наши значения в 9 раз [273]. В *C. barbata*, отобранной в г. Эрегли, содержание Cd и Pb приближалось к 0, концентрация Zn в два раза, а Cu – в 33 раза выше полученных нами значений [274].

Уровни концентрации Cd, Cu и Zn в пробах *C. barbata*, отобранных из разных мест у греческих городов Неа Фокеа, Каландра, Агия-Триас, Аликес, Лехония, Монолитос, Периволос, Гераклион и Ханья [251] имели сходные значения с нашими данными, за исключением Pb, средняя концентрация которого в водорослях из акватории Севастополя значительно выше (Таблица 4.2). Сравнение содержания тяжелых металлов в водорослях, собранных в Венецианской лагуне в весенний и осенний периоды 1999 г [94], показало, что концентрации Zn и Cu в *C. barbata* из акваторий Севастополя были значительно ниже, а свинца выше, чем в цистозире из Венеции. Концентрации Cd, Cu, Pb и Zn, в пробах *Cystoseira* sp., собранных с 5 станций вдоль побережья острова Линоза, Сицилия (южное Тирренское море, Италия) [106], и из цистозир с пляжей Мерса-Матрух (Египет) [179] оказались сходными с нашими данными.

Практически во всех работах, в которых сравнивают микроэлементный состав водорослей из загрязнённых промышленными и бытовыми стоками и относительно чистых районов, выявлена прямая зависимость накопления тяжёлых металлов в макрофитах от концентрации элементов в среде [10, 15, 27]. При этом зафиксирована общая закономерность: с увеличением концентрации металлов в среде возрастает их содержание в тканях водных растений.

В целом следует отметить, что цистозире из акватории Севастополя накапливают значительно больше свинца по сравнению с водорослями из других мест обитания, а концентрация меди и кадмия не сильно зависит от района отбора проб. Концентрации цинка в макрофитах из прибрежных акваторий Турции, Греции и Италии имеют более высокие значения по сравнению с нашими данными. Поэтому можно сделать вывод, что более высокие концентрации цинка в пробах *C. barbata*, отобранных в Карантинной бухте, характеризуют акваторию, как подверженную антропогенному загрязнению.

Таблица 4.2 – Содержание тяжелых металлов в бурых водорослях рода *Cystoseira* ($\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$) из Средиземноморского бассейна

Место отбора проб	Cd	Cu	Pb	Zn	Источник
<i>C. barbata</i>					
Синоп (Турция)	$1,30 \pm 0,02$	$4,15 \pm 0,03$	$5,3 \pm 2,4$	$12,1 \pm 5,1$	[145]
Силе (Турция)	-	-	-	$18,6 \pm 7,7$	«---»
Рива (Турция)	$1,08 \pm 0,02$	$12,33 \pm 0,18$	$8,3 \pm 1,2$	$7,0 \pm 2,8$	«---»
Игнеада (Турция)	-	-	-	<7	«---»
Пазар (Турция)	$0,64 \pm 0,06$	$4,12 \pm 2,18$	$6,7 \pm 1,87$	$12,0 \pm 2,6$	[273]
Ризе (Турция)	$0,66 \pm 0,12$	$6,30 \pm 0,04$	$14,1 \pm 1,21$	$61,2 \pm 1,1$	«---»
Силе (Турция)	<0,02–0,78 ($\pm 0,1$)	2,2 ($\pm 0,08$) - 5,7 ($\pm 0,12$)	<0,1–1,4 ($\pm 0,2$)	13,9 ($\pm 0,3$) - 35,1 ($\pm 0,3$)	«---»
Синоп (Турция)	<0,02–<0,2	1,7 ($\pm 0,02$) - 6,0 ($\pm 0,01$)	<0,1–3,5 ($\pm 0,4$)	6,5 ($\pm 0,9$) - 191,5 ($\pm 0,4$)	«---»
Şarköy (Турция)	<0,02	$5,2 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,2$	$113,5 \pm 0,2$	«---»
Эрегли (Турция)	<0,02	$164,3 \pm 0,8$	<0,1	$41,8 \pm 0,1$	[274]
Неа Фокеа (Греция)	0,47	6,1	2,1	22,3	[251]
Каландра (Греция)	0,83	8,8	2,5	16,4	«---»
Агия-Триас (Греция)	0,06	1,7	0,02	29,8	«---»
Аликес (Греция)	0,4	2,1	0,02	18,7	«---»
Лехония (Греция)	2,6	3,2	0,02	58,1	«---»
Монолитос (Греция)	0,4	2,7	0,02	17,2	«---»
Периволос (Греция)	1,4	0,7	0,02	8,8	«---»
Гераклион (Греция)	1,1	3,8	0,02	14,2	«---»
Ханья (Греция)	2,7	1,7	0,02	24,5	«---»
Венецианская лагуна (Италия)	<0,1–0,2	2 - 21	$1,4 \pm 0,0$ - $5,6 \pm 0,7$	15 (± 4) - 88 (± 11)	[94]

продолжение таблицы 4.2

Ризе, Трабзон, Синоп (Турция)	$0,55 \pm 0,04$	$2,47 \pm 0,18$	$4,62 \pm 0,32$	$6,62 \pm 0,26$	[277]
Анапа (Россия, Краснодарский край)	$0,3 \pm 0,05$	$3,6 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$18,2 \pm 0,6$	[34]
пгт Форос (Россия, Севастополь)	$1,0 \pm 0,3$	$4,8 \pm 2,0$	$19,8 \pm 5,4$	$19,5 \pm 5,4$	Наши данные
Карантинная бухта (Россия, Севастополь)	$2,1 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,7$	$18,9 \pm 7,6$	$29,0 \pm 9,8$	«---»
<i>Cystoseira</i> sp.					
Сирийское побережье	$<0,1 - <0,5$	7,21 (2,22)	1,31 (0,70)	14,37 (2,87)	[67]
О. Линоза (Италия)	$0,32 (\pm 0,04)$ $-2,58 (\pm 0,88)$	$4,44 (\pm 0,16)$ $-8,24 (\pm 1,47)$	$1,33 (\pm 0,16)$ $-14,57 (\pm 1,70)$	$22,5 (\pm 2,5) -$ $28,2 (\pm 2,8)$	[106]
Сардиния (Италия)	1,72	1,80	10,3	52,4	[253]
Мерса-Матрух (Египет)	0,54	8,66	18,31	27,90	[179]
Эгейское море (Турция)	$0,03 (\pm 0,00)$ $-7,23 (\pm 0,78)$	$6,64 (\pm 1,13)$	$0,90 (\pm 0,13)$ $-62,1 (\pm 5,4)$	$-80,3 (\pm 10,4)$ $-295 (\pm 21)$	[73]

Среднегодовая концентрация Pb в *C. barbata* из акватории Фороса составила 14-29 мг·кг⁻¹, из Карантинной бухты – 2-38 мг·кг⁻¹, что превышает санитарные нормы [50]. Концентрация As составила 33 мг·кг⁻¹, Hg – 0,3 мг·кг⁻¹. Содержание Cd в *C. barbata* из Карантинной бухты превышает предельно допустимые концентрации (ПДК) в 2-3 раза. Следует учитывать, что при определении ПДК для гидробионтов необходимо учитывать комбинационные эффекты воздействия металлов. Поэтому получаемые традиционными методами ПДК отдельных металлов без анализа комплексообразования и их комбинированного действия оказываются лишь приблизительными и не отражают реальную токсичность тяжелых металлов [20].

4.3.1 Концентрация меди и цинка в некоторых видах черноморских бурых водорослей

Средняя концентрация меди в бурых водорослях из Балаклавской бухты изменяется незначительно (от 6,4 до 7,3 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$), а содержание цинка – более чем в 2 раза (от 12 до 24,8 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$) (Таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Средняя концентрация меди и цинка в некоторых черноморских бурых водорослях

Вид	Концентрация, $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$	
	медь	цинк
<i>Cladostephus spongiosus</i>	6,4	12
<i>Cystoseira barbata</i>	7,3	24,8
<i>Cystoseira crinita</i>	4,0	19,2
<i>Dictyota spiralis</i>	4,0	20
<i>Padina pavonica</i>	4,0	18

У *Cladostephus spongiosus* и *C. barbata* отмечено более высокое содержание меди, что, вероятно, связано со спецификой местообитания водорослей, а также свойствами их систем защиты от оксидативного и токсического стресса.

В целом, полученные данные по содержанию меди и цинка в черноморских бурых водорослях сходны со значениями концентраций тяжелых металлов у видов, произрастающих в других акваториях [13]. Следует отметить, что концентрация меди и цинка в макрофитах значительно ниже ПДК для продовольственного сырья морского происхождения [50].

4.4 Содержание различных микроэлементов в ветвях *C. barbata*

Бурые водоросли являются хорошим биоиндикатором загрязнения прибрежных вод тяжелыми металлами и др. элементами. Использование для этих

целей ветвей *C. barbata*, имеющих жизненный цикл 7 мес., дают возможность проводить мониторинг загрязнения акваторий за относительно кратковременный промежуток времени.

Ионы ряда металлов являются важными микроэлементами для живых организмов (например, Cu, Zn, Mg, Mn, Fe, Mo, Ni, Co), но при высоких концентрациях они становятся токсичными для водной флоры [293]. ТМ дезактивируют белки, денатурируют ферменты и нарушают функции клеток. Также они вызывают образование реактивных форм кислорода, которые, в свою очередь, нарушают функции белков, липидов и ДНК, вызывают окислительный стресс и гибель клеток [148]. Молодые ветви цистозиры возрастом 2-3 мес. активно накапливают Cu, Zn, Cr, Mn, Fe, Mo, Co (Рисунок 4.8), что подтверждает важную биологическую роль этих металлов для бурых водорослей. В III возрастной группе концентрации элементов значительно снижаются, а в дальнейшем равномерно возрастают в ветвях IV-V возрастных групп, что связано с экологическими условиями обитания водорослей, т.к. при длительном токсическом воздействии этих металлов на растение, вероятно, возникает неконтролируемое внутренними физиологическими процессами их накопление.

В опытах с бурой водорослью *Sargassum pallidum*, красной *Grateloupia turuturu* и зеленой *Ulva fenestrata* показано, что небольшие дозы тяжелых металлов у всех видов усиливают фотосинтез за счет повышения обменных процессов. Повышение дозы тяжелых металлов вызывает резкое снижение фотосинтеза путем подавления механизмов регуляции минерального обмена, обеспечивающих их выведение [31].

В разновозрастных ветвях *C. barbata* в достаточно высоких концентрациях содержится стронций и барий, при этом в наибольших количествах во 2 возрастной группе ветвей (Рисунок 4.9). Стронций и барий имеют сходные химические свойства с кальцием, но ни один из них не является необходимым для роста растений. Однако оба эти элемента могут присутствовать в среде в значительных количествах и прямо или косвенно влиять на рост растений путем конкуренции и замены основных элементов, то есть кальция и магния [210].

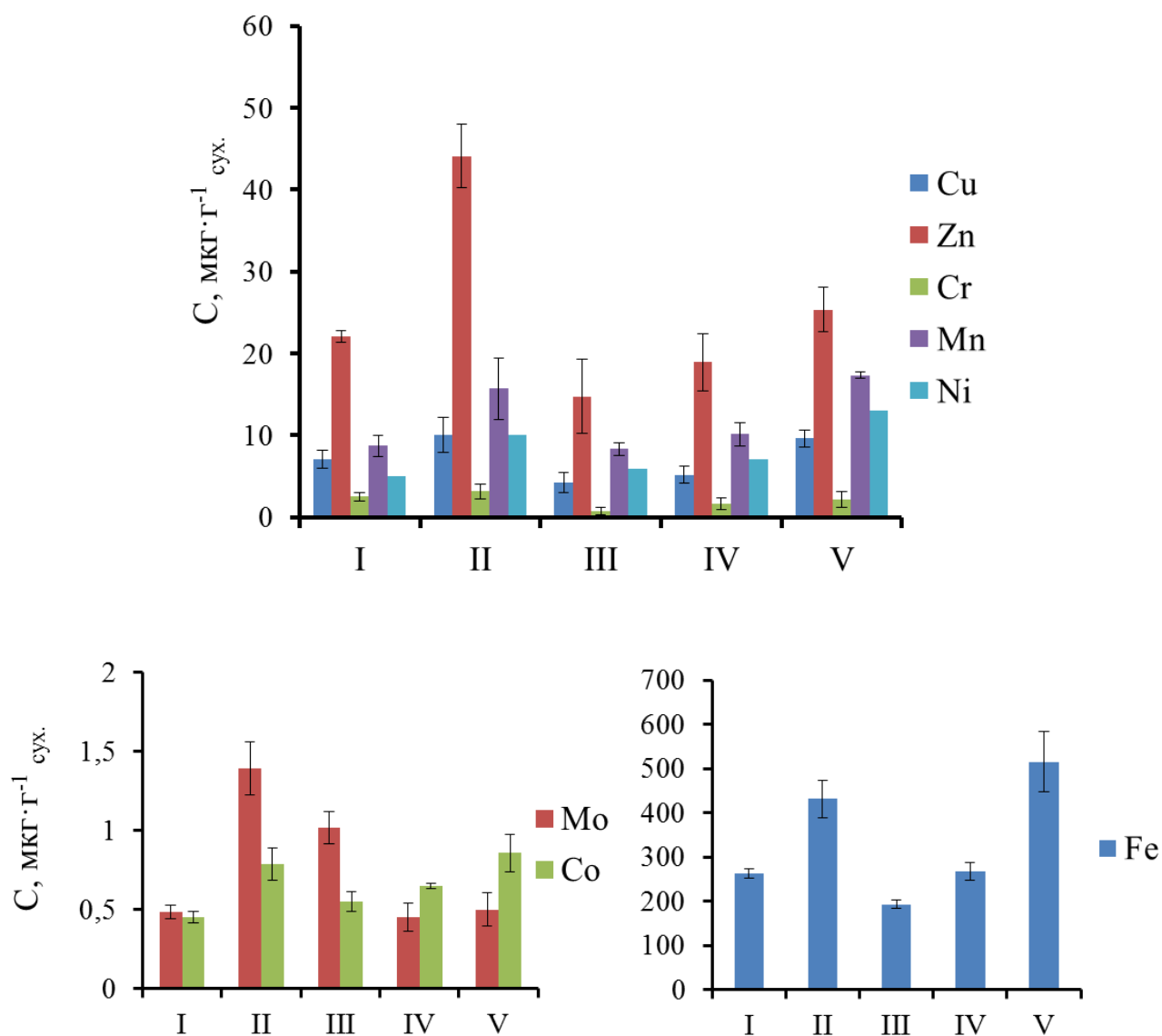


Рисунок 4.8 – Концентрации (C) поливалентных металлов в ветвях *Cystoseira barbata* первого порядка. Июль 2017 г. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

Концентрация рубидия также максимальна в ветвях 2-3 мес., что связано с его биологической значимостью. В растениях рубидий может частично замещать калий, и при калиевом дефиците стимулировать рост растения [125].

Бурые водоросли, по сравнению с красными и зелеными, содержат большое количество мышьяка. Несмотря на то, что As содержится во многих организмах, его биологическая роль остается слабо изученной [123]. Мышьяк в морской воде и

осадках содержится в виде высокотоксичных арсената (As(V)) и арсенита (As(III)). Большое количество исследований посвящено тому, как у морских организмов происходит детоксикация от постоянного воздействия неорганического As [122]. В живых организмах As вызывает окислительный стресс, генотоксичен, изменяет процесс репарации ДНК и супрессирует белок p53 [82].

Среднее содержание As в цистозире совпадает с его концентрацией в бурых водорослях *Myelophycus caespitosus* и *Undaria pinnatifida* [222]. В сравнительно малых количествах As содержится в ветвях возрастом 3-5 мес.

Накопление водорослями алюминия отражает состояние экологической обстановки в акватории, так как этот элемент не имеет особой биологической значимости для живых организмов. Относительно высокие концентрации Al содержатся в морских растениях, большинство видов содержит более чем $200 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}_{\text{сух}}$, и некоторые – более $3000 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}_{\text{сух}}$. Более чем 90 % всего Al связано с водонерастворимыми или водорастворимыми органическими фракциями клеточной стенки [124]. I группа ветвей *C. barbata* содержит Al в количестве $3040 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$; это максимальная концентрация среди всех групп ветвей.

Среди большого разнообразия морских организмов существует лишь несколько видов, обладающих сродством к связыванию Sr^{2+} , например акантарии [270]. Вероятно, эти виды имеют специфические свойства связывания и Sr^{2+} транспортную систему, аналогичную Ca^{2+} . Стронций по своим химическим свойствам похож на кальций, и ионы Sr^{2+} могут заменить Ca^{2+} во многих функциональных процессах, однако клеточные структуры организмов способны различать Ca^{2+} и Sr^{2+} . В экспериментальных условиях транспортная система *C. barbata* была воспроизведена на двухслойных (билипидных) мембранных структурах и имела $\text{Sr}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ коэффициент дискриминации 7 [270]. Это значительно выше, чем коэффициенты дискриминации для двухвалентных катионов в известных природных ионофорах. Ионы стронция этого морского организма могут функционировать как ионы кальция в отношении к некоторым двухвалентным катионозависимым метаболическим процессам.

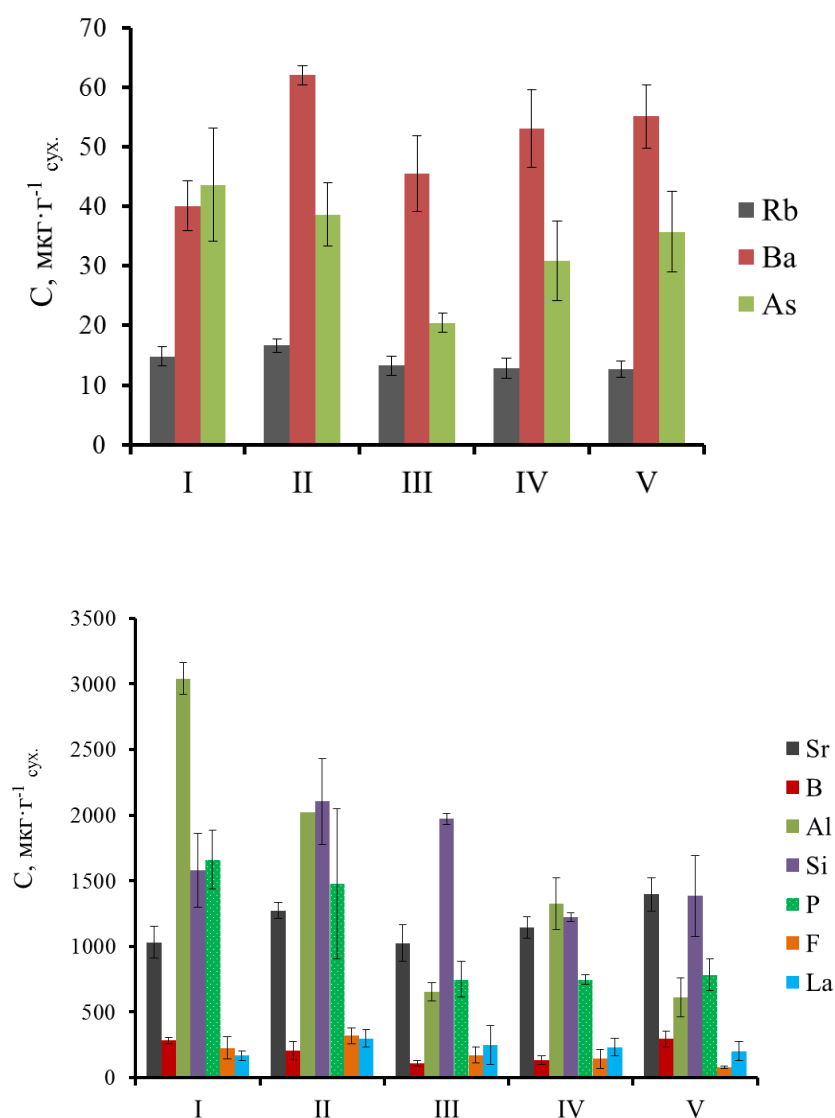


Рисунок 4.9 – Концентрации (C) микро- и макроэлементов в ветвях *Cystoseira barbata* первого порядка. Июль 2017 г. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

Кремний играет важную роль в процессах жизнедеятельности растений [195]. Известно, что Si аккумулируется в зеленых и бурых водорослях [228]. Предполагается, что клеточная стенка является основным сайтом локализации Si. Зеленая водоросль *Cladophora glomerata* аккумулирует Si в качестве питательного вещества, необходимого для их роста, при котором происходит распределение Si в клеточной стенке [219]. Авторы также указали на ингибирование роста водоросли

двуокисью германия, который является конкурентным ингибитором Si. Диоксид германия подавляет рост ламинарии, фукусовых и 10 других видов бурых водорослей [257]. Достоверно не установлено, необходим ли Si бурым водорослям в качестве микроэлемента для роста.

Исследования показали, что некоторые бурые водоросли аккумулируют Si в повреждённых участках макрофита, выполняя защитную функцию [151]. Растения обычно обладают конститутивной резистентностью, которая опосредуется через морфологические и химические системы. Показано, что Si распределен в кутикуле и сорусах, повреждённых тканях и апопластах между эпидермальными и внешними клетками корового слоя вегетативных тканей. Кремний способствует защите от инфекции и заживлению поврежденных участков, в то время как увеличение повреждённой области предотвращается такими защитными веществами, как сульфатированные полисахариды [217]. Таким образом, Si играет важную роль в резистентности водорослей. Максимальный уровень Si отмечен в ветвях *C. barbata* 2-3 месяца, при этом в I-III группах концентрации примерно на 30% выше, чем в IV-V группах (Рисунок 4.9). Возможно, что это связано с формированием клеточных стенок в процессе роста растения.

Самая высокая концентрация лантана в морских организмах зарегистрирована у макроводорослей [166]. Отмечено, что у бурых водорослей способность абсорбировать La на порядок ниже, чем у красных и зеленых. Исследования сезонных колебаний поглощения металла бурыми водорослями *Sargassum kjellmanianum* показали, что увеличение накопления La менее выражено в период роста в феврале, по сравнению с другими элементами. В цистозире также отмечена достаточно высокая концентрация La и относительно равномерное его распределение в разновозрастных ветвях, с максимумом во II группе ($300 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$) (Рисунок 4.9).

Различные уровни накопления лантаноидов в макрофитах связаны с тем, что бурые водоросли поглощают металл из морской воды с более низкой эффективностью накопления, а красные и зеленые – из лантаноид-содержащих суспендированных силикатных частиц [137]. Молекулярная или ионная мимикрия

– процесс, в результате которого поглощаются несущественные, катионные виды металлов через мембраны. Катионы, таким образом, имитируют существенный элемент и ошибочно воспринимаются структурным элементом транспортного пути макрофита [88]. Например, ионы трехвалентного лантаноида напоминают ионы кальция в нескольких своих химических свойствах: они проявляют ионную связь, не имеют значительного ковалентного связывания и имеют примерно одинаковый размер. Из-за более высокого отношения заряда к объему, Ln^{3+} имеет значительно более высокое сродство к сайтам связывания на белках и заменяет Ca^{2+} (а также Mg^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+}) [129].

В морских организмах галогены входят в состав различных соединений, варьирующихся от пептидов, поликетидов, индолов, терпенов, ацетогенинов и фенолов до летучих галогенированных углеводородов. Бромид чаще используется водорослями для производства органогалогенов, хотя в морской воде хлор встречается в более высоких концентрациях, чем бром [92]. Распространенность галогенов в морских водорослях не одинакова: хлор и бром, по-видимому, являются основными галогенами, используемыми для увеличения биологической активности вторичных метаболитов, тогда как фтор остается довольно необычным в химических структурах [224]. Исследования биологических свойств галогенированных соединений показало, что они обладают антибактериальной, противогрибковой, противовирусной, противовоспалительной, антипролиферативной, цитотоксической и др. активностью [83].

Отметим, что концентрация фтора в *S. barbata* достигает своего максимума во II группе ветвей, а брома – в IV (рисунки 4.9 и 4.10). Германий распределен между группами равномерно, без ярко выраженных пиков. Селен в больших количествах содержится в молодых ветвях I группы, а максимальная концентрация Se отмечена в старых ветвях V группы.

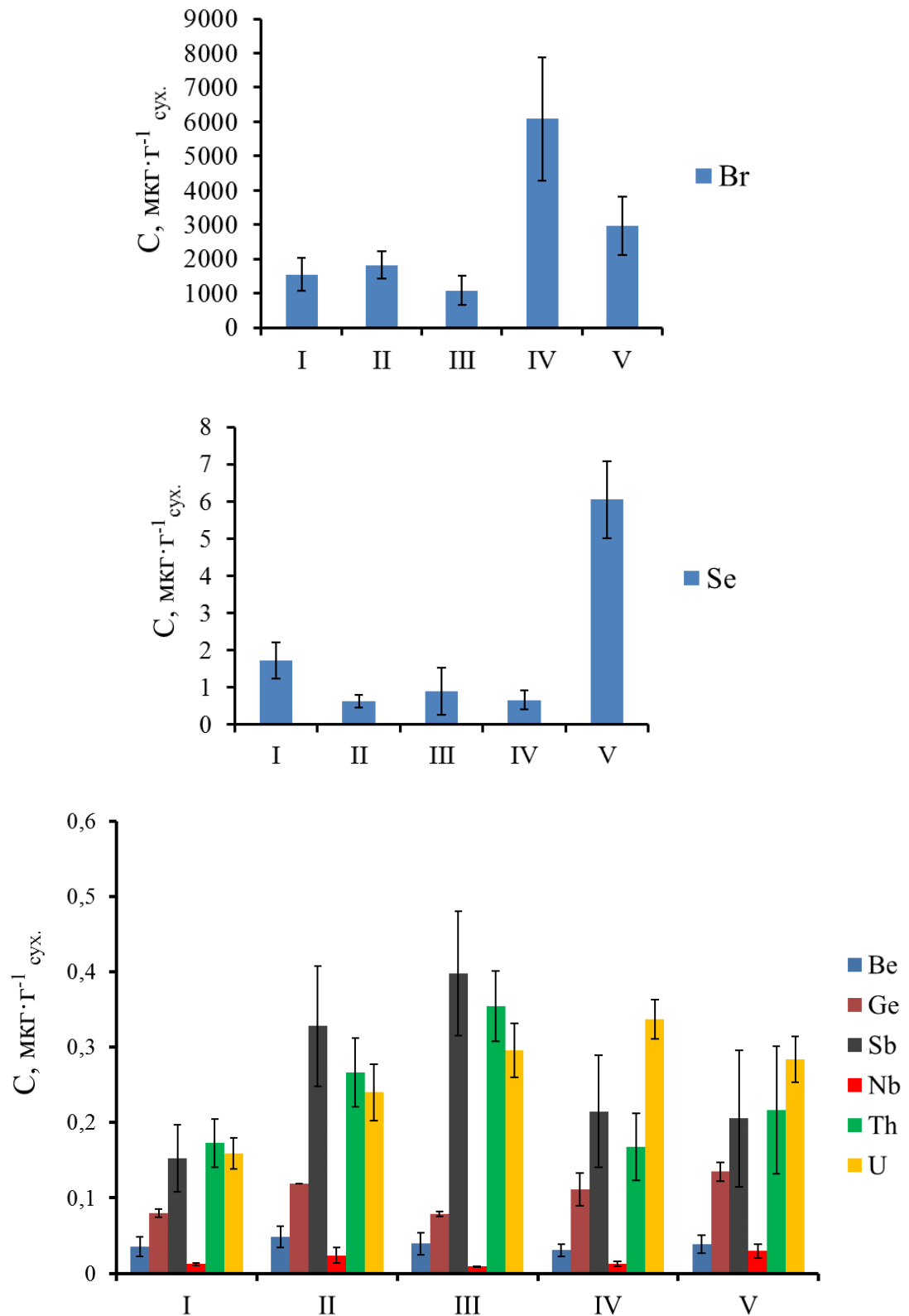


Рисунок 4.10 – Концентрации (C) микроэлементов в ветвях *Cystoseira barbata* первого порядка. Июль 2017 г. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

В организмах, содержащих Se, этот элемент в виде аминокислоты селеноцистеина включается в каталитический сайт важных селенопротеинов, которые в основном участвуют в детоксикации и процессах гашения реактивного кислорода (ROS) [90]. Однако Se в высоких дозах может стать токсичным для организмов, действуя как прооксидант, прежде всего из-за его способности заменять Se в белках, которые затем теряют правильную структуру. Избыток Se также может истощать глутатион внутри клетки, что вызывает накопление ROS [252]. Содержание селена в бурых водорослях *Fucus ceranoides* варьирует от 0,05-0,51 мкг·г⁻¹ [276]. По нашим данным концентрация селена в *C. barbata* имеет сходные значения для II-IV групп ветвей (0,6-0,8 мкг·г⁻¹), и значительно более высокие для I и V групп (1,7 и 6,0 мкг·г⁻¹).

Фосфор является одним из основных биогенных элементов, ввиду его важной роли в процессах энергетического метаболизма. Он также входит в структуру нуклеиновых кислот. В бурых водорослях P включен в состав систем, ассоциированных с процессом накопления углерода в форме углеводов (маннитол, ламинарин, β -1,3-глюкан) [84]. В метаболизме маннитола P необходим для ряда реакций с маннитол-1-фосфат дегидрогеназой и маннитол-1-фосфатазой [170]. Маннитол имеет ряд физиологических функций в качестве хранилища углерода и осмолита. В больших количествах присутствует в бурых водорослях, где его синтез включает две стадии: маннит-1-фосфатдегидрогеназа (M1PDH) катализирует обратимую реакцию между фруктозо-6-фосфатом (F6P) и маннитол-1-фосфатом (M1P); маннит-1-фосфатаза гидролизует M1P до маннита. В обеих реакциях присутствует P, что показывает его важную функцию в данном процессе [84]. В ветвях *C. barbata* I и II возрастных групп отмечен повышенный уровень P, далее с возрастом ветвей его содержание снижается. Вероятно, высокий уровень фосфора в молодых ветвях связан с его интенсивным метаболизмом в процессе роста.

Концентрации свинца, кадмия, ртути, титана, циркония, ванадия и вольфрама достигают своего максимума в ветвях *C. barbata* возрастом 2-3 мес. (Рисунок 4.11). Переходный элемент Ti в растворенной форме играет важную роль в жизни растений [131]. Многие аспекты биологической роли Ti остаются неизвестными.

Титан и галлий активируют процесс фотосинтеза, меняя редокс-статус специфических регуляторных белков и вызывая повышение ферментативной активности [188]. Показано наличие связи между Ti и Ga с активностью фруктозо-1,6-бисфосфотазы. Это объясняет высокие концентрации галлия и титана в молодых ветвях I-II групп *C. barbata*.

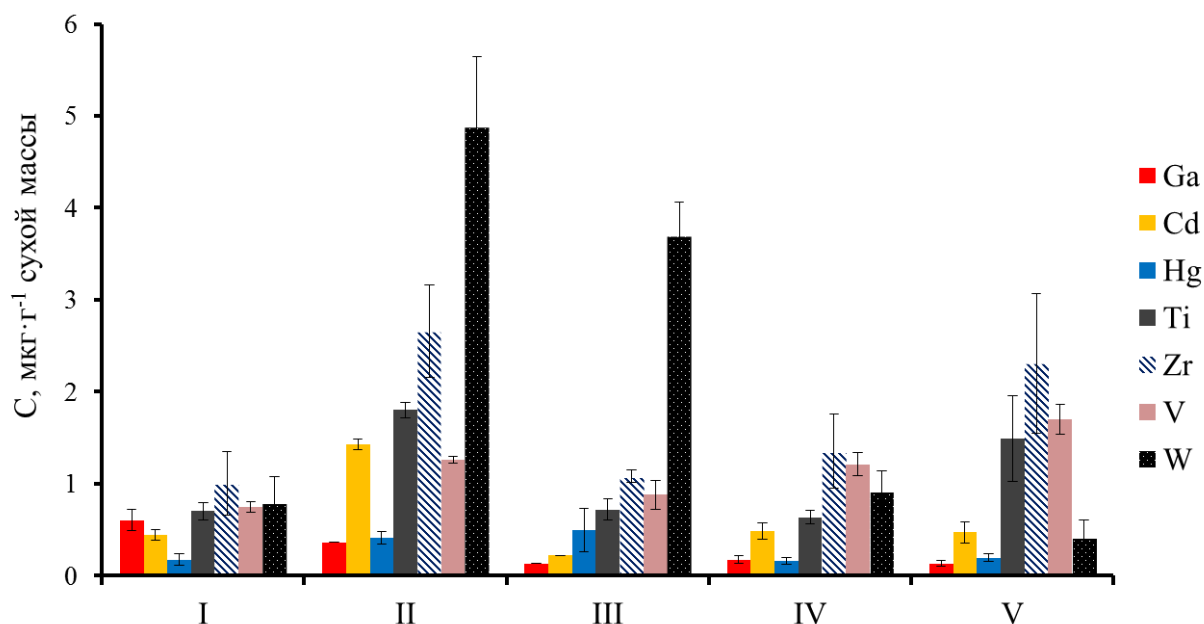


Рисунок 4.11 – Концентрации (C) микроэлементов в ветвях *Cystoseira barbata* первого порядка. Июль 2017 г. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес., V – $6 >$ мес.

Ртуть является одним из наиболее токсичных элементов и в сравнительно больших концентрациях содержится в макрофитах. Связывание Hg с сульфгидрильными (-SH) группами нарушает нормальные клеточные ферментативные процессы. Также под воздействием Hg увеличивается концентрация свободных радикалов [176]. Ртуть является более токсичной, чем Cd, Pb, Cu или Ag [124]. Максимальная концентрация ртути $0,5 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1}$ отмечена в III возрастной группе ветвей *C. barbata*.

Цирконий обладает низкой биотоксичностью. В зависимости от дозы и химической формы Zr может проявлять как положительные, так и токсические

эффекты на водоросли. Исследования на *Ch. pyrenoidosa* показали, что добавление Zr уменьшало концентрацию P, Mg, Cu в клетках водорослей, а концентрации Fe, Mn и частично Zn были выше, по сравнению с контролем [260]. Концентрации хлорофилла a, хлорофилла b, ксантофиллов и каротиноидов уменьшались на 13-33 % в обработанных культурах. Также изменялось соотношение хлорофилл a : хлорофилл b. Авторы также наблюдали антагонизм между Ti и Zr. По нашим данным максимальная концентрация Ti и Zr отмечена во II возрастной группе ветвей *C. barbata*: 2,6 и 1,8 мкг·г⁻¹, соответственно (Рисунок 4.11).

Отметим высокие концентрации вольфрама во II и V возрастных группах *C. barbata* (Рисунок 4.11). Морские водоросли обладают исключительной способностью абсорбировать галогены (антиоксиданты неорганической природы). Природа разработала необычные методы введения атомов галогена в органические соединения с использованием галогенирующих ферментов. Ванадий-зависимая галопероксидаза является одним из наиболее изученных типов среди этих ферментов из-за его биокаталитических свойств, включая высокую стабильность и толерантность к теплу и органическим растворителям [107]. Его можно разделить на ванадий-зависимую хлоропероксидазу, ванадий-зависимую бромпероксидазу и ванадий-зависимую иодепероксидазу, в зависимости от окислительной способности ионов галогена.

II возрастная группа *C. barbata* имеет высокие концентрации вольфрама (Рисунок 4.11). W – токсичный элемент, способен замещать молибден в живых организмах, при этом он ингибирует активность молибден-зависимых ферментов, например, ксантиноксидазы. При избыточном поступлении W в растениях развиваются симптомы молибденовой недостаточности: накапливается большое количество нитратов, развивается хлороз. Содержание бериллия в *C. barbata*, в нашем исследовании, значительно ниже, чем приведено в работе [124].

В целом, полученные нами усредненные величины содержания элементов в *C. barbata* имеют сходные значения с аналогичными данными для цистозиры из других мест обитания [94, 145, 192, 251, 273 274, 277]. Так, авторы [192] отбирали пробы также в районе наших исследований - в Карантинной бухте летом 2012 г. -

и определяли содержание различных элементов в ветвях и разновозрастных стволах цистозир. Усредненные концентрации Al, Co, Ni, Zn, As, Rb, Sr, Ba и U в ветвях *C. barbata* имеют сходные значения с нашими данными; Br, Sb имеют более низкие значения, а V, Mn и Fe – более высокие. Отметим, что с увеличением возраста ствола концентрация Al, V, Mn, Fe, Ni, Zn, Rb, Sr, Ba, Br, U снижалась, содержание кобальта и мышьяка оставалось на одном уровне, а сурьмы – возрастали. По нашим данным, концентрации всех вышеперечисленных элементов, за исключением алюминия и мышьяка, в старых ветвях 5 группы (более 6 мес.), в отличие от стволов, увеличивались.

В целом, нами установлено, что концентрации макро- и микроэлементов в цистозирах по степени убывания составляют следующий ряд: Al>Br>Si>Sr>P>Fe>La>F>Ba>As>Zn>Rb>Y>Mn>Ni>Cu>Bi>Pb>W>Cr>Se>Zr>V>Ti>Cd>Hg>Ga>U>Sb>Th>Ge>Be.

Заключение. Максимальные концентрации макро- и микроэлементов в большинстве случаев (70 %) найдены в ветвях цистозир возрастной группы 2-3 месяца. Вероятно, высокий уровень содержания элементов в молодых ветвях водорослей связан с интенсивным метаболизмом растений в процессе роста. В ветвях *C. barbata* этой возрастной группы активно накапливается цинк, медь, хром, марганец, никель, железо, молибден и кобальт, что подтверждает важную биологическую роль этих металлов для макрофитов. Также в ветвях цистозир найдены высокие концентрации бария, кремния, фтора, ванадия, вольфрама, циркония, титана, германия, свинца и кадмия. В обоих видах цистозир, обитающих в эвтрофированной бухте, отмечено более высокое содержание цинка, меди и свинца, чем в условно чистом районе. Также отмечены межвидовые различия в содержании цинка, концентрации которого в ветвях *C. barbata* в течение года выше, чем у *C. crinita*. Концентрация цинка в стволах *C. crinita* превышала в 2-3 раза содержание Zn в ветвях, данная зависимость не обнаружена для *C. barbata*.

Содержание свинца в ветвях *C. barbata* находится в противофазе с количеством цинка в макрофитах. Это может быть вызвано тем, что данные металлы являются биологическими антагонистами. Избыточная концентрация

цинка приводит к снижению уровня свинца в растении за счёт его связывания и выведения из пула живых клеток. В фазе угнетения роста водорослей отмечена противоположная тенденция. Поэтому можно предположить, что противофазность уровней цинка и свинца в тканях цистозир может быть вызвана адаптивной реакцией растения на загрязнения среды обитания тяжёлыми металлами. Бурая водоросль *C. barbata* является хорошим биоиндикатором загрязнения прибрежных вод тяжёлыми металлами и др. элементами. Использование для этих целей морфологических структур цистозир – ветвей, имеющих небольшой жизненный цикл (7 мес.), дают возможность проводить мониторинг загрязнения акваторий за относительно короткий промежуток времени. В наибольшей степени для этого подходят данные по накоплению большинства элементов в ветвях цистозир возрастом 2 - 3 мес. Дальнейшие исследования содержания макро- и микроэлементов в организмах-биоиндикаторах, а также в воде и грунте позволят охарактеризовать степень загрязнения морской среды различными элементами антропогенного происхождения.

ГЛАВА 5 АНТРОПОГЕННОЕ ВЛИЯНИЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ФУКОКСАНТИНА В БУРЫХ ВОДОРОСЛЯХ РОДА *CYSTOSEIRA*

Тяжелые металлы не подвержены биологическому разложению и являются глобальной проблемой, связанной с их токсичностью, разнообразием источников и накоплением в окружающей среде [119]. Переходные металлы изменяют метаболизм организмов путем стимулирования продуцирования реакционноспособных видов кислорода (ROS) [171]. Генерация ROS в организме активирует соответствующие защитные системы, направленные на подавление негативных эффектов окислительного стресса. Часть этих систем стремятся предотвратить образование ROS, а другие их нейтрализуют. Эта защита включает в себя антиоксиданты [171].

В морских экосистемах металлы встречаются в воде, осадках, взвешенном веществе и биоте. Исследования содержания металлов в окружающей среде не дают информации об их доступности для живых организмов [89]. Тяжелые металлы в водорослях являются полезными индикаторами загрязнения окружающей среды [159].

Макроводоросли могут накапливать металлы, растворенные в воде, и переносить их на более высокие трофические уровни. Так как они имеют прикрепленный образ жизни, длительный жизненный цикл и легкодоступны для отбора проб, макроводоросли считаются отличными экологическими биомониторами [89].

Ранее влияние загрязняющих веществ (тяжелые металлы, ПАВы и др.) на организмы, обитающие в загрязненных бухтах, определено через изменения в структуре сообществ, таких как разнообразие, богатство видов и численность. Такие экологические методы характеризуются реализмом, но требуют много времени и затрат, а влияние обнаруживается, когда оно уже произведено. С другой стороны, химические аналитические методы могут определять концентрации химических веществ с предоставлением информации по потенциально неблагоприятным последствиям. В соответствии с этим, цель данного

исследования – оценить влияние содержания некоторых тяжелых металлов на концентрацию основного ксантофилла бурых водорослей – фукоксантина, или выявить возможную связь между их концентрациями, на примере бурых водорослей *Cystoseira crinita* и *C. barbata*.

5.1 Методология обработки результатов измерений концентрации фукоксантина и тяжёлых металлов в макрофитах

Полученные ранее результаты, приведенные в главах 3 и 4, обладают определенной неоднородностью, что затрудняет анализ исследуемых зависимостей для ряда тяжёлых металлов и пигментного состава водорослей (фукоксантин). Для гомогенизации выборки данных использован ряд методов из области статистического анализа и регрессионного моделирования [135].

5.1.1 Принцип нормализации экспериментальных данных

Нормализация результатов измерений проведена с помощью метода множественной линейной регрессии с установкой коэффициентов нормальности распределения и линейной поправки. Для нормализации было использовано следующее регрессионное уравнение:

$$Y = \sum_{i=1}^n a_i x_i + b_0 + e,$$

где a_i – коэффициент регрессии, b_0 – свободная поправка, e – поправка на ошибку, которая сводятся к нормальности распределения с нулевым вектором математического ожидания и корреляционной матрицей. По методу множественной линейной регрессии смоделирован ряд скорректированных значений, которые формируют более реалистичную картину градиентов концентраций металлов и фукоксантина. Усреднение значений проведено с целью удаления критерия видоспецифичности, являющегося дополнительным

параметром высокой сложности, ассоциированного с широким спектром биологических процессов и систем.

5.1.2 Процесс моделирования и нормализации результатов

Для моделирования нормализованной кривой концентраций тяжёлых металлов применена многослойная нейронная сеть [105], использующая машину опорных векторов [78]. Обучение нейросети проведено согласно данным измерений, приведенных в настоящей работе, а также опубликованным в литературных источниках [73]. Все значения, которые не удовлетворяли условиям регрессионного анализа, отсеяны методом эпсилон-чувствительной трубки, где исключаются все значения, выходящие за рамки доверительного интервала (Рисунок 5.1). Выборки, построенные на основе работы нейросети, подвергнуты сравнительному анализу с исходными данными и показали высокий характер однородности с отклонением P не более 0,02.

На рисунках 5.2 – 5.4 приведем результаты нормализации данных по свинцу в цистозирах. Необходимость нормализации этих данных определена тем, что условия экспериментального определения концентрации металлов и фукоксантина варьировали в широком диапазоне, что способствовало накоплению внутренней ошибки метода измерения. Следовательно, именно накопленная ошибка может привести к появлению ложных минимумов и максимумов концентраций металлов в сезонной динамике для *C. crinita* и *C. barbata*.

Предварительная обработка и нормализация данных по концентрации меди и цинка не потребовалась, так как динамика изменений этих параметров формируют устойчивый тренд, отображающий четкую сезонную зависимость.

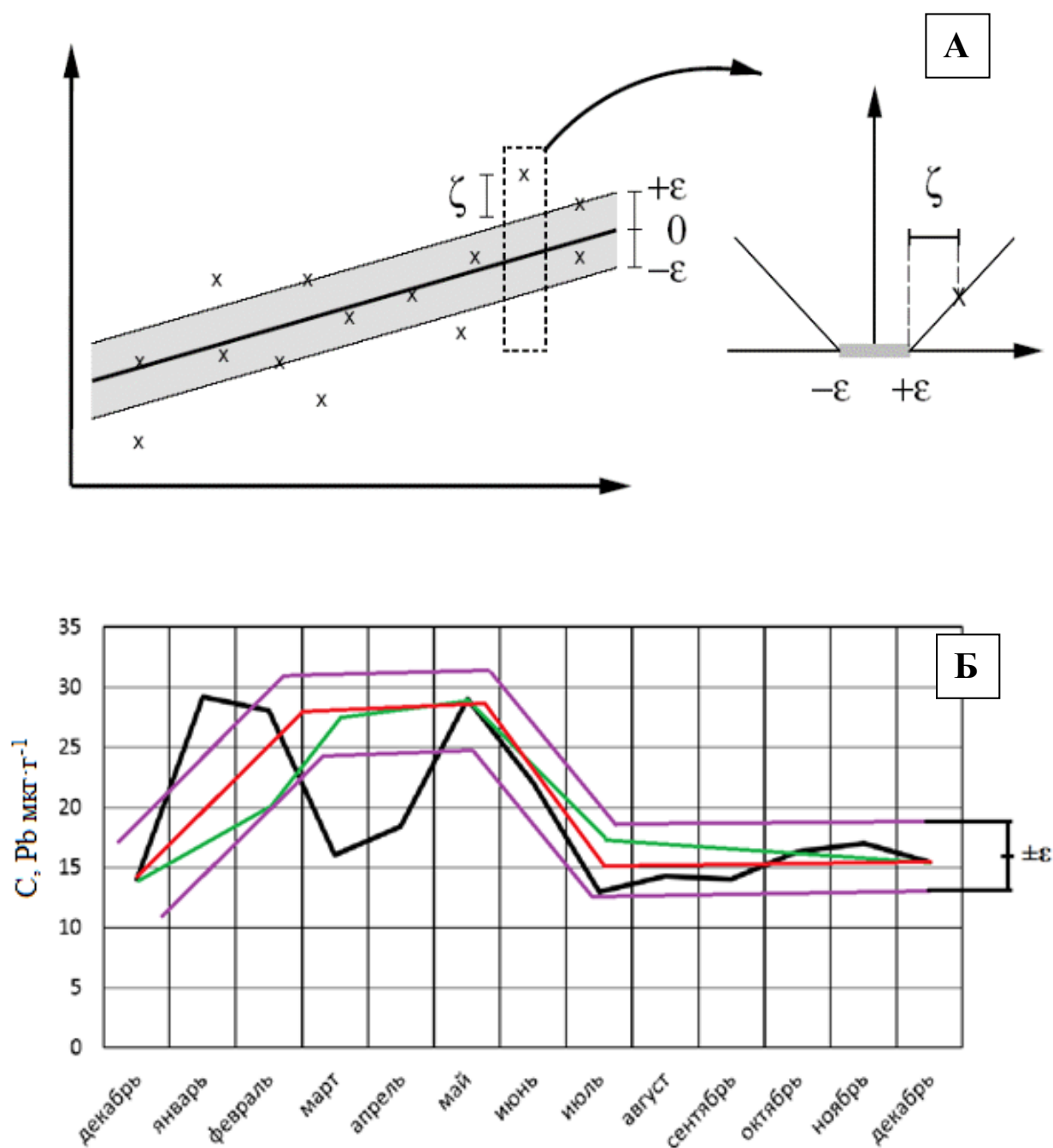


Рисунок 5.1 – А – построение эpsilon-трубки по опорным векторам на основе расширенных доверительных интервалов, Б – построение эpsilon-чувствительной трубки и отсеивание результатов

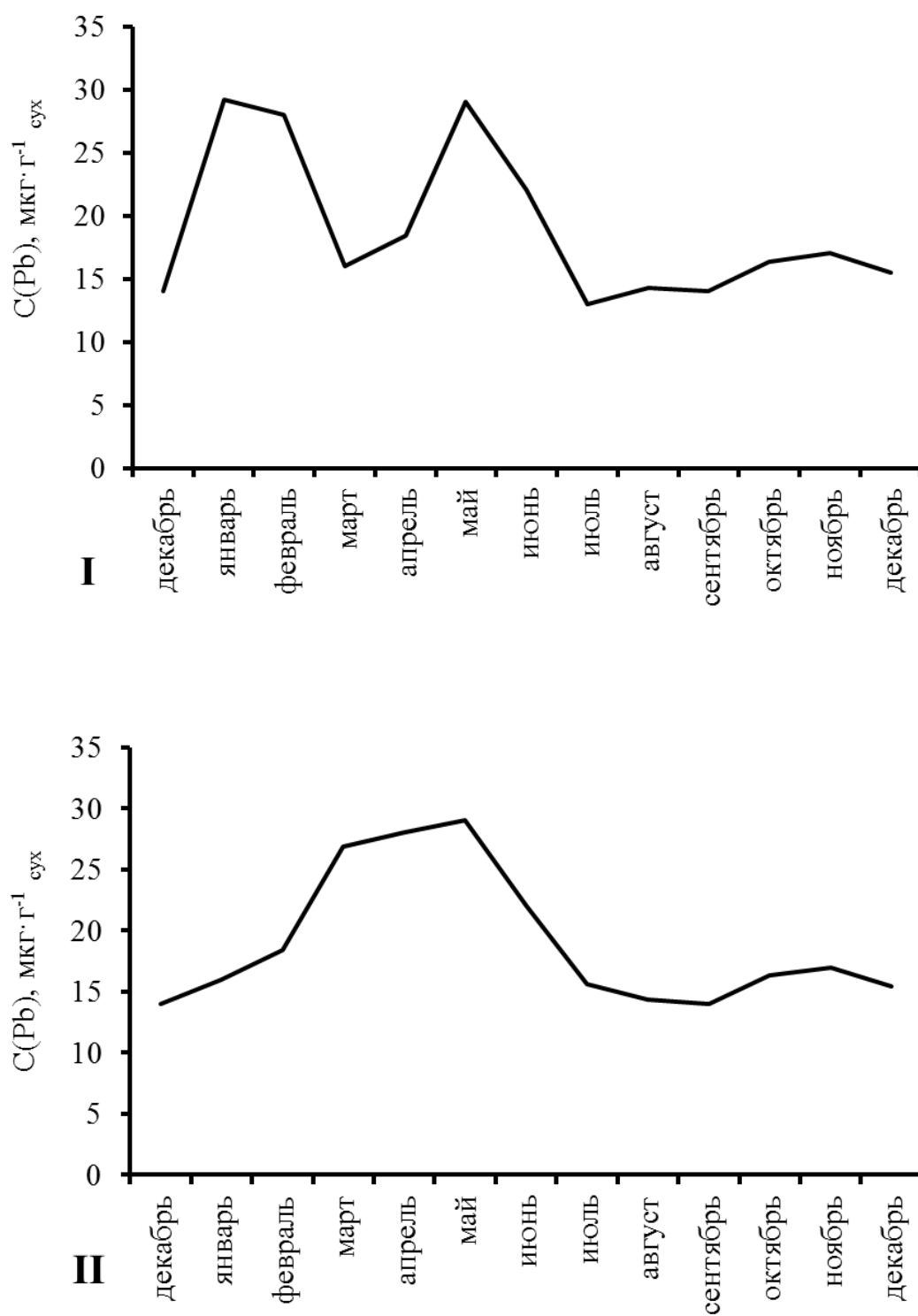


Рисунок 5.2 – Усредненные значения концентрации свинца в цистозирах из акватории Фороса до нормализации данных (I) и после нормализации (II)

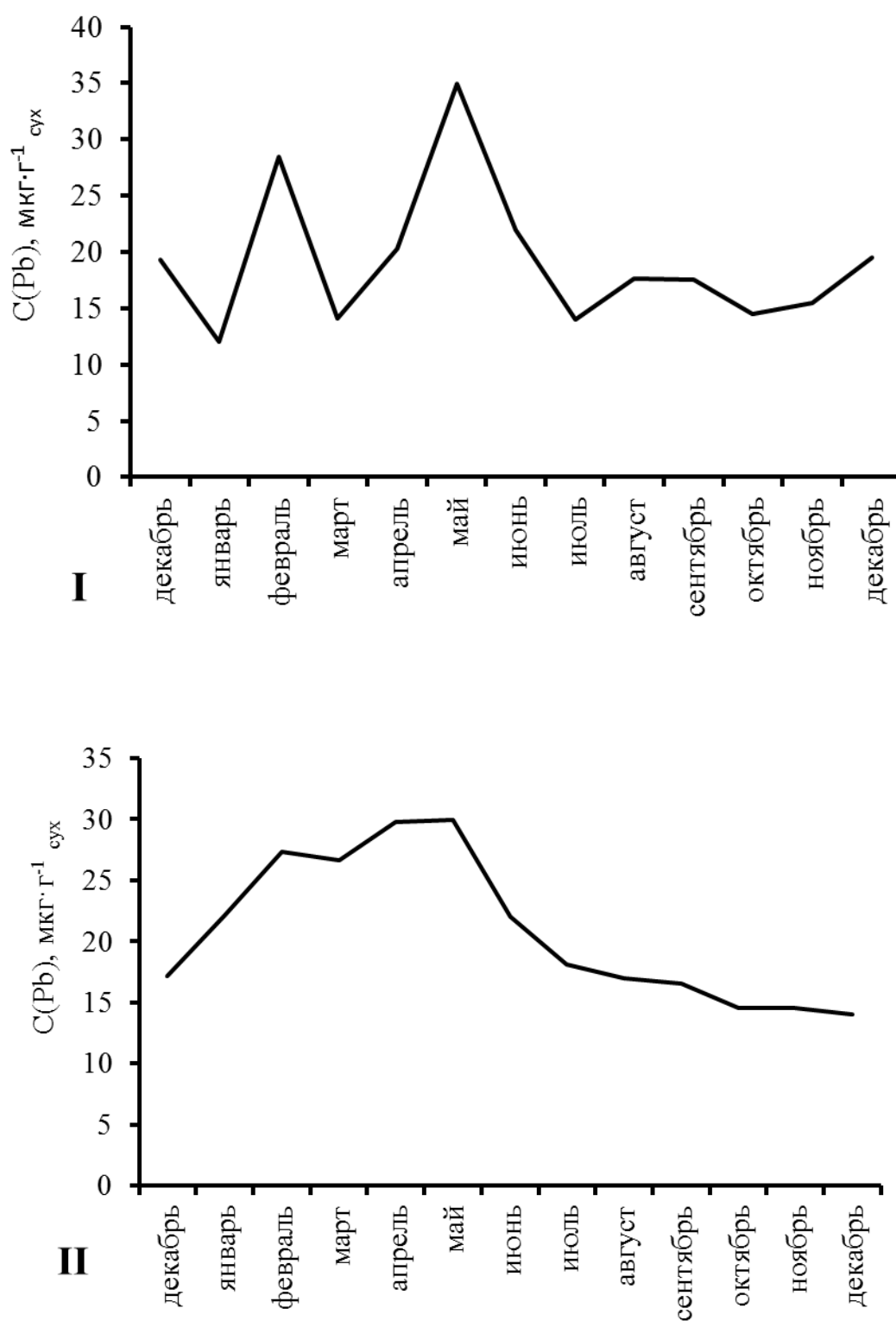


Рисунок 5.3 – Усредненные значения концентрации свинца в цистозирах из Карантинной бухты до нормализации данных (I) и после нормализации (II)

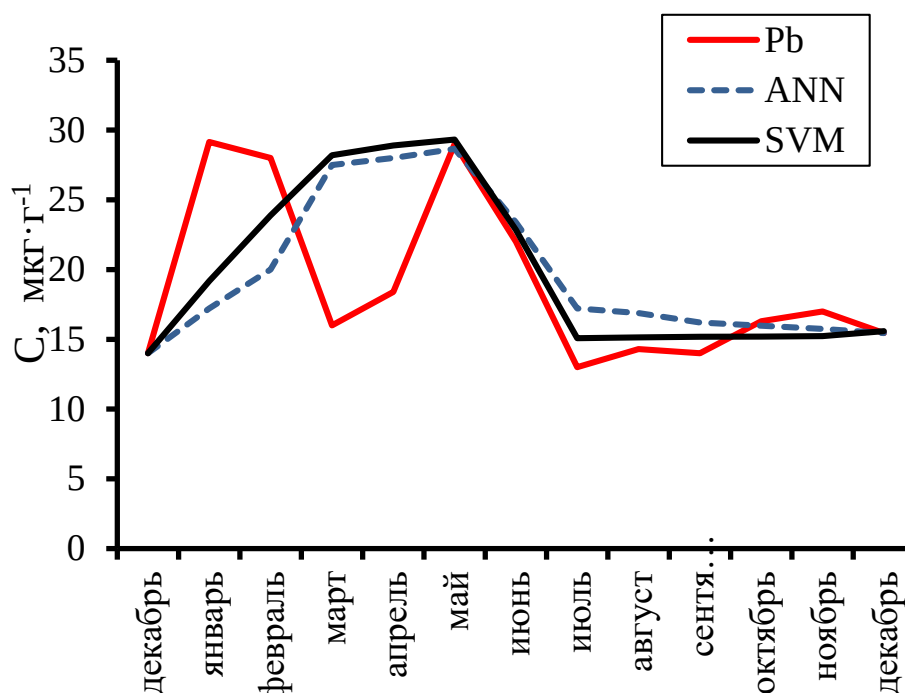


Рисунок 5.4 – Средняя концентрация свинца в цистозирах из акватории Фороса; ANN – предсказанные концентрации средних значений свинца, SVM – опорный вектор

5.2 Определение зависимости между содержанием фукоксантина и свинца в водорослях

Рассмотрим нормализованные усредненные данные, характеризующие концентрации свинца в двух видах цистозир в разных акваториях (Рисунок 5.5). Сезонная динамика изменения концентраций свинца в *Cystoseira crinita* и *C. barbata* коррелирует с периодами вегетации водорослей. Для обоих регионов характерно наличие пиковых концентраций в период с марта по май, что свидетельствует о сезонном характере загрязнения акваторий, когда основная часть загрязняющих веществ попадает в акваторию моря с ливневыми и талыми водами. Средние значения концентрации Pb в цистозирах из Карантинной бухты немного выше, чем для акватории Фороса.

Карантинная бухта расположена в черте г. Севастополя, где наблюдается повышенная антропогенная нагрузка за счёт более высокой концентрации различного рода техногенных источников загрязнения вод. В акватории города попадают тяжёлые металлы из-за большого количества портовых зон и ремонтно-технических баз, обслуживающих гражданский и военный флот. Основным источником свинца в данной акватории служит материал антикоррозийной обработки корабельных корпусов – свинцовый сурик, где основным компонентом является тетраоксид трисвинца Pb_3O_4 , обладающий высокими окислительными свойствами. В водную среду свинец попадает при постепенном разрушении лакокрасочного покрытия (ЛКП) корабельных корпусов, а также вследствие смыва разрушенного ЛКП в сухих доках при пескоструйной или дробеструйной обработке корпусов на ремонтно-технических базах.

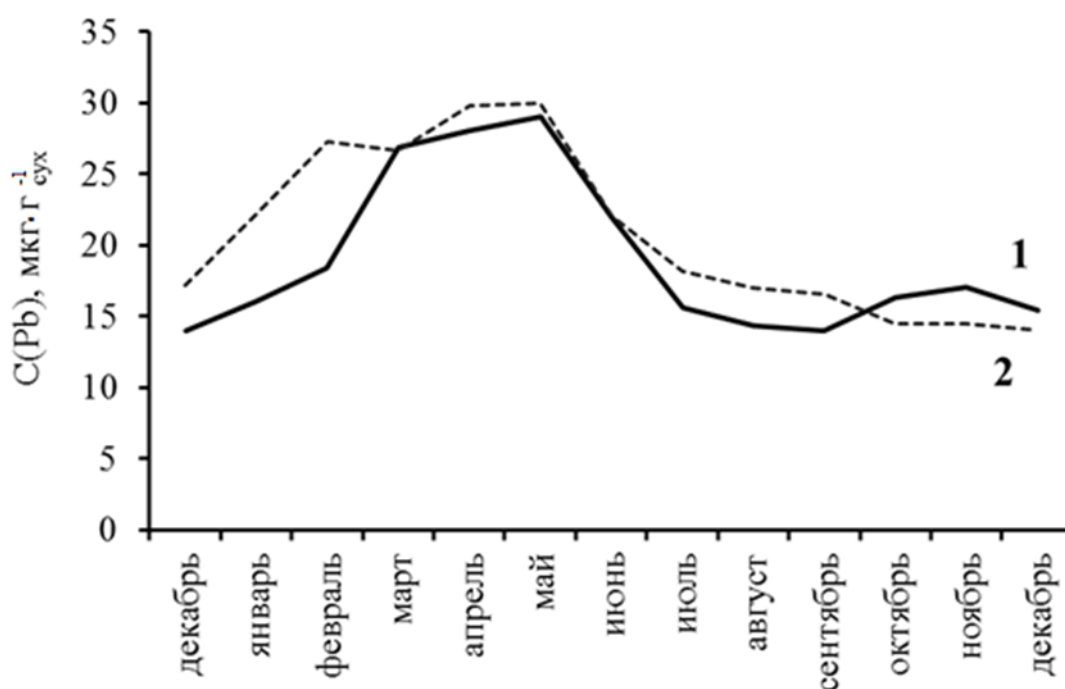


Рисунок 5.5 – Средние нормализованные значения концентрации свинца в цистозирах: 1 – из акватории Фороса; 2 – из Карантинной бухты

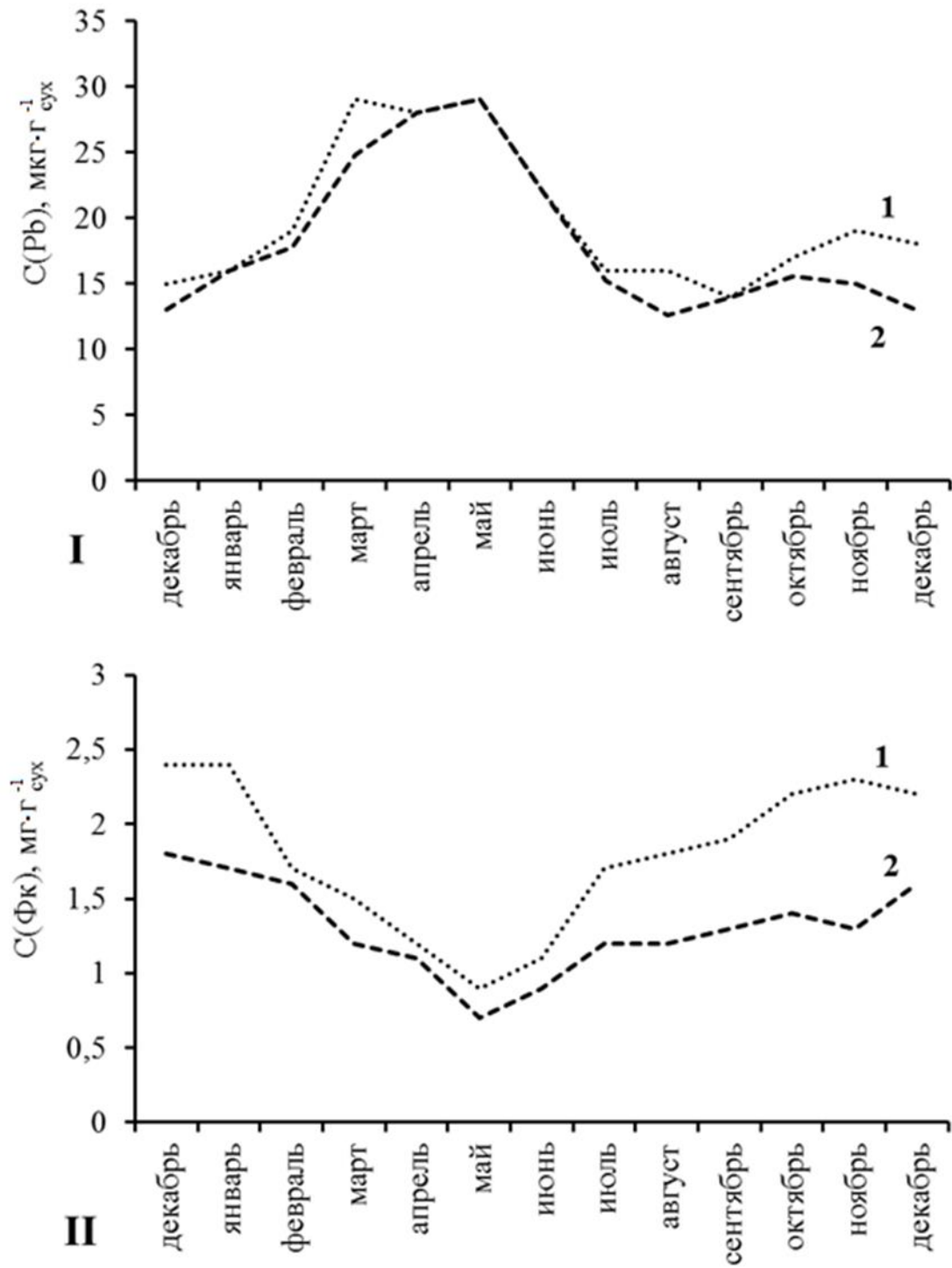


Рисунок 5.6 – Нормализованные показатели концентрации свинца (I) и фукоксантина (II) в *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) из акватории Фороса

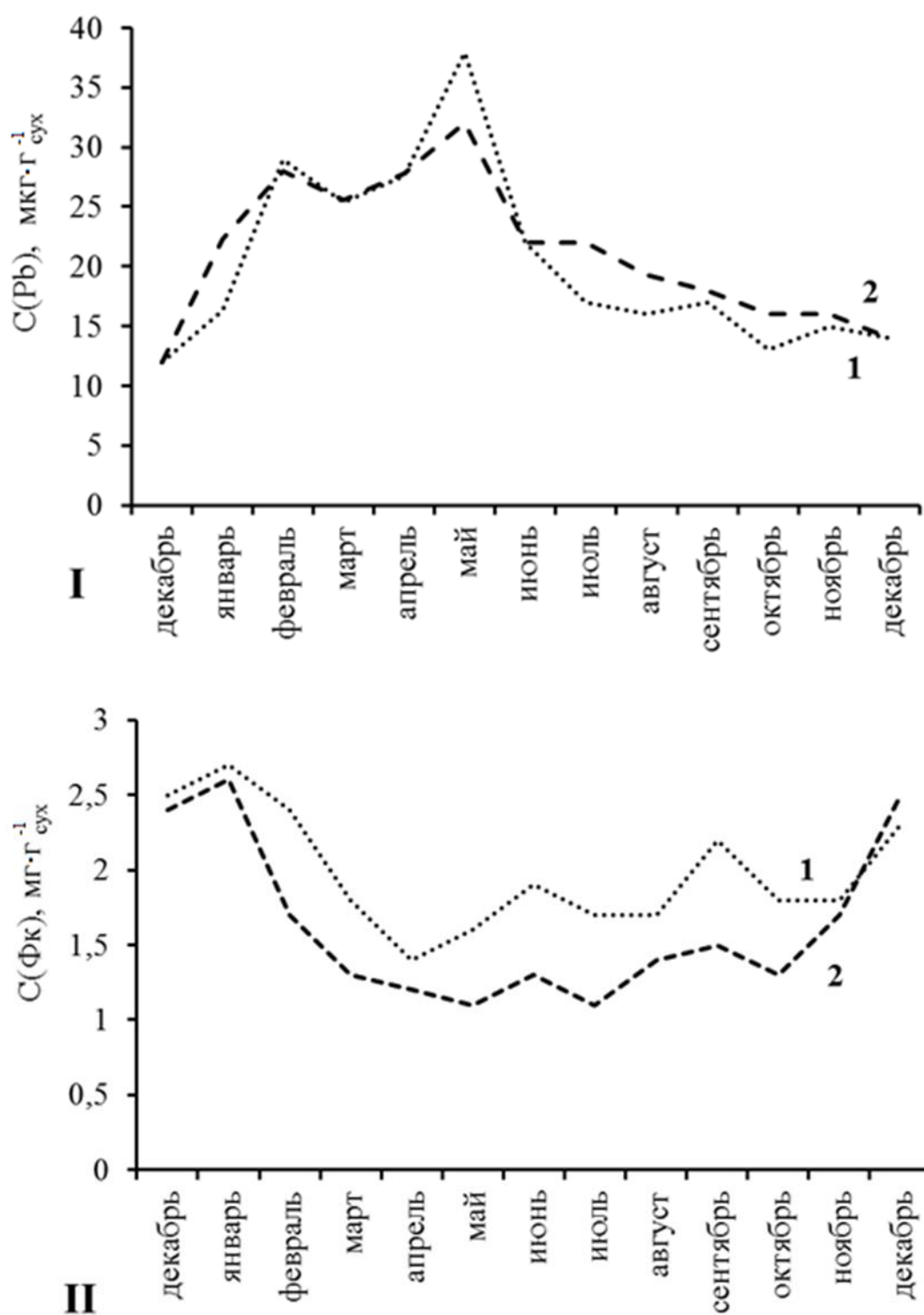


Рисунок 5.7 – Нормализованные показатели концентрации свинца (I) и фукоксантина (II) в *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) из Карантинной бухты

Рассмотрим видоспецифическое распределение свинца у цистозир из двух акваторий (см. рисунки 5.6 (I) и 5.7 (I)). Для зоны с низкой антропогенной нагрузкой (акватория Фороса) концентрации Pb для обоих видов имеют близкие значения. При этом характер изменения содержания Pb в водорослях идентичен и не имеет выраженных видовых особенностей. Поэтому нет оснований говорить о видоспецифичном характере аккумуляции Pb макрофитами. Тем не менее, следует отметить, что для *C. crinita* характерно плавное изменение концентраций Pb, а для *C. barbata*, наоборот, – наличие промежуточных пиков. Такой характер концентрационной динамики позволяет предположить о более высокой активности систем аккумуляции Pb у *C. barbata*, что, возможно, является видоспецифическим критерием.

Собранные в Карантинной бухте образцы 2 видов водорослей имеют разнородный во времени характер аккумуляции свинца. Так, у *C. crinita* концентрация Pb в течение года равномерно возрастает до пика в мае с последующим плавным снижением до минимальных значений в августе. У *C. barbata*, наоборот, отмечен выраженный бимодальный пик концентраций свинца в феврале и мае, во время которых уровень Pb выше, чем у *C. crinita*.

Анализ тенденции сезонных изменений содержания фукоксантина в макрофитах показал, что графики (см. рисунки 5.6 (II) и 5.7 (II)) не имеют выраженной модальности, и максимальная концентрация пигмента отмечена в мае для акватории Фороса и апреле – мае для Карантинной бухты. При этом у водорослей наблюдается межвидовая разница: концентрация фукоксантина в *C. barbata* выше, чем у *C. crinita* вне зависимости от места отбора проб, что свидетельствует о видоспецифичном характере продукции фукоксантина.

Для двух видов цистозир минимальная концентрация Фк соответствует максимальным концентрациям свинца в пробах. При возрастании концентрации пигмента наблюдается снижение концентрации Pb. Стоит отметить, что скорость изменения концентрации фукоксантина у *C. barbata* из Карантинной бухты выше, чем у *C. crinita*.

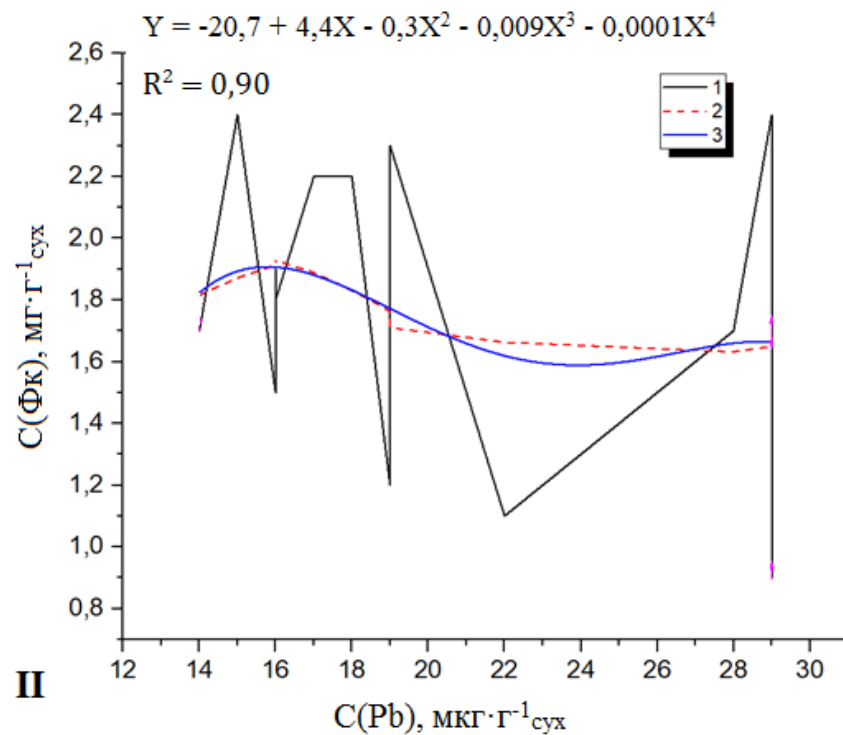
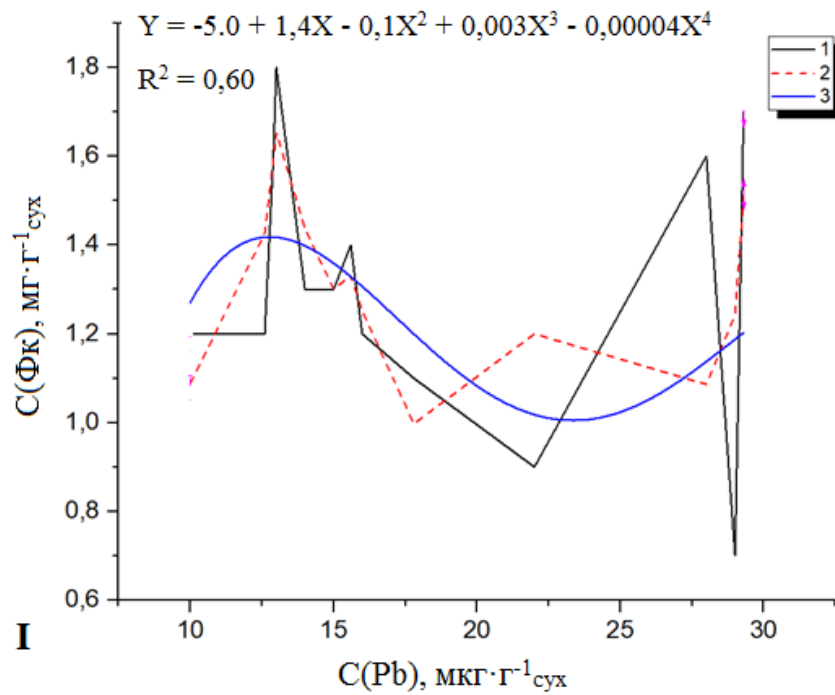


Рисунок 5.8 – Связь между концентрацией свинца и фукоксантина в 2-3 мес. ветвях *C. crinita* (I) и *C. barbata* (II) из акватории Фороса: 1 – исходное соотношение концентраций свинца и фукоксантина; 2 – сглаженные показатели методом Савицкого-Голея; 3 – промоделированная зависимость на основе полиномиальной аппроксимации

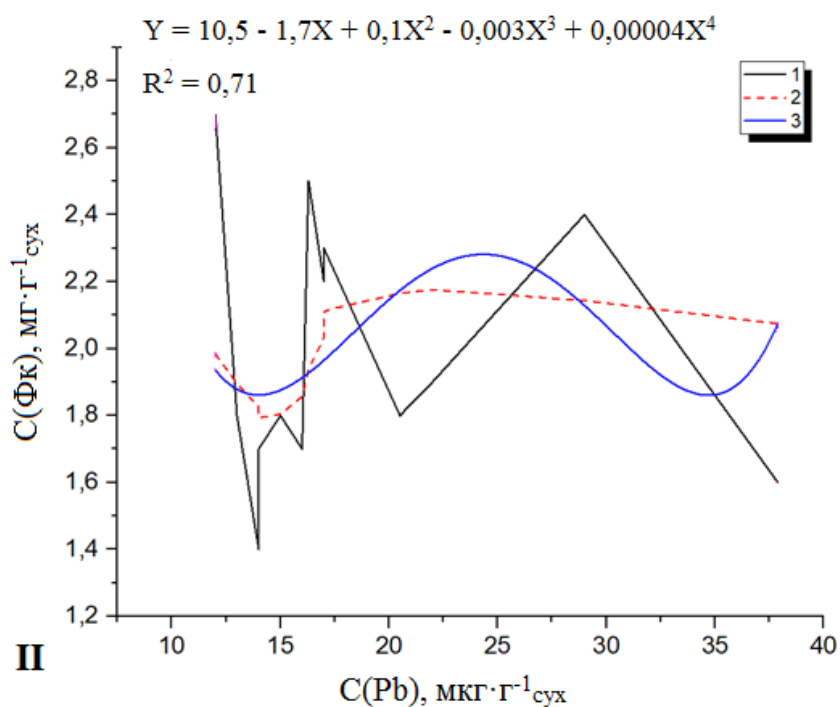
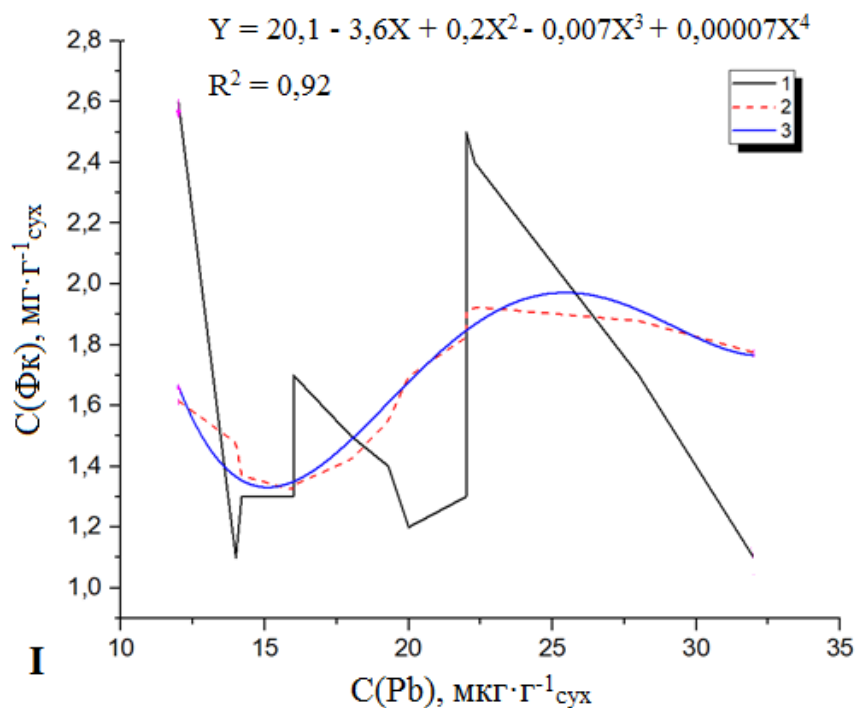


Рисунок 5.9 – Связь между концентрацией свинца и фукоксантина в 2-3 мес. ветвях *C. crinita* (I) и *C. barbata* (II) из акватории Карантинной бухты: 1 – исходное соотношение концентраций свинца и фукоксантина; 2 – сглаженные показатели методом Савицкого-Голея; 3 – промоделированная зависимость на основе полиномиальной аппроксимации

Возможно, что различная концентрация Pb прямо или косвенно влияет на изменение концентрации Фк. Следовательно, можно предположить, что у *C. barbata* фукоксантин включён в систему биорегуляции уровня Pb более интенсивно, чем у *C. crinita*.

Положительные (в ветвях *C. crinita* из акватории Фороса ($R^2=0,60$) и в *C. barbata* из Карантинной бухты ($R^2=0,71$)) или высокие (в ветвях *C. barbata* из акватории Фороса ($R^2=0,90$) и в *C. crinita* из Карантинной бухты ($R^2=0,92$)) корреляции найдены между содержанием Фк и свинца. Все рассматриваемые зависимости приобрели вид биквадратного уравнения:

$$y=a+b_1x+b_2x^2+b_3x^3+b_4x^4,$$

где коэффициенты уравнения приведены на графиках (рисунки 5.8, 5.9).

5.3 Определение зависимости между содержанием фукоксантина и меди в водорослях

Концентрация меди в цистозирах изменяется синхронно для обеих акваторий (Рисунок 5.10). При этом для макрофитов из акватории Фороса отмечен пик концентрацией Cu в июле, а для Карантинной бухты – зимой. В целом, усреднённый уровень содержания Cu в макрофитах из Карантинной бухты выше, чем в цистозирах из акватории Фороса.

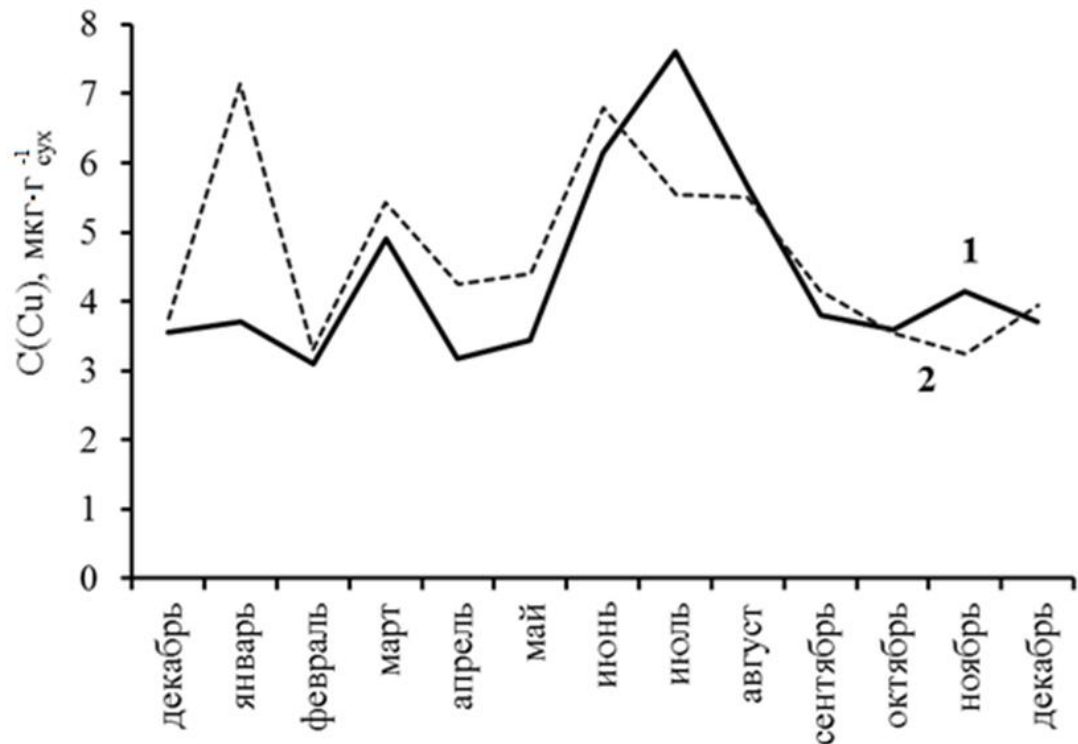


Рисунок 5.10 – Средние значения концентрации меди в цистозирах: 1 – из акватории Фороса; 2 – из Карантинной бухты

Следует отметить, что корреляционной зависимости между концентрациями меди и фукоксантина у цистозир не отмечено: показатели изменяются независимо друг от друга (рисунки 5.11 и 5.12). При сравнении графических зависимостей видно, что *C. barbata* имеет более высокий уровень концентрации Cu, по сравнению с *C. crinita*.

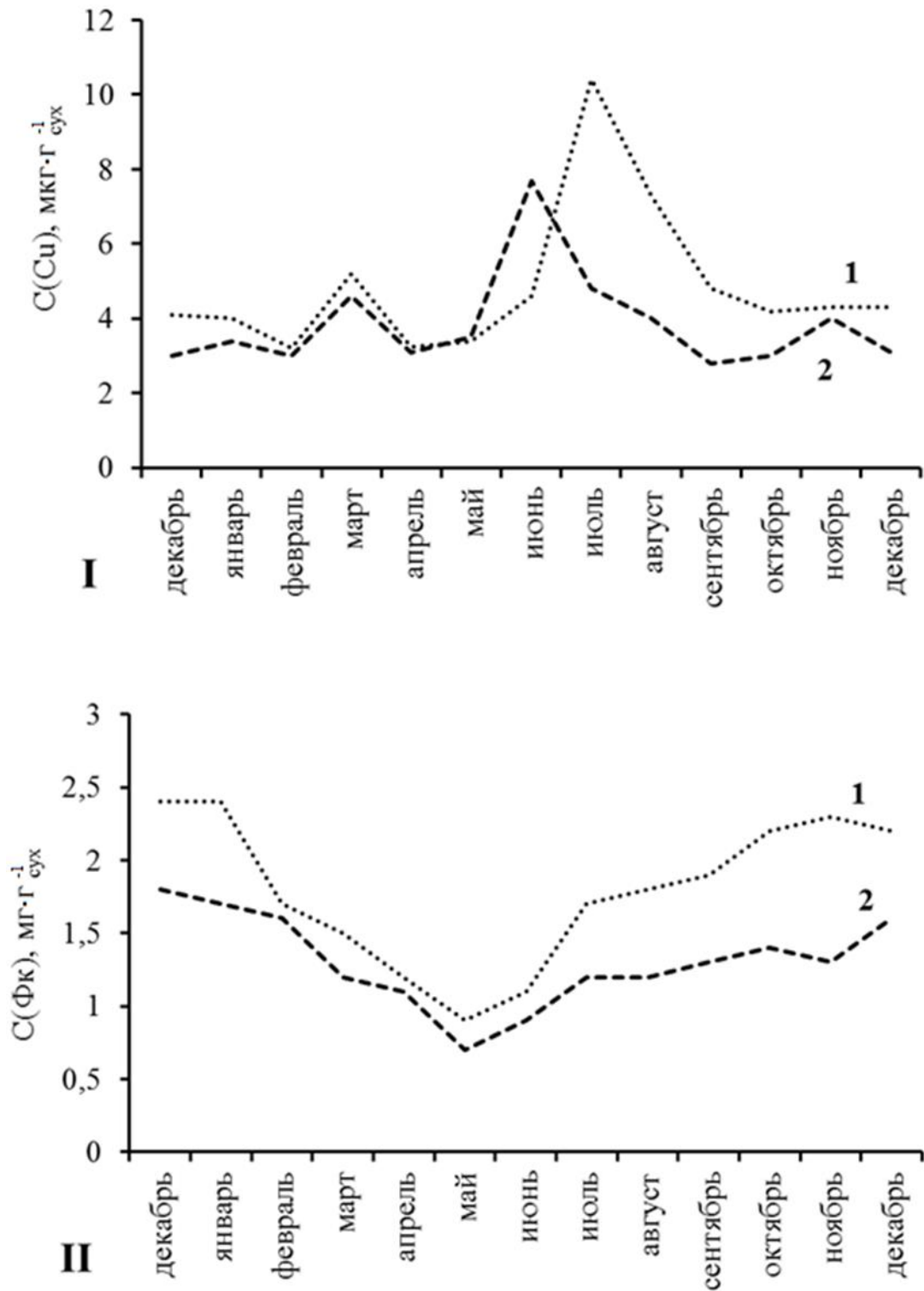


Рисунок 5.11 – Концентрации меди (I) и фукоксантина (II) в *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) из акватории Фороса

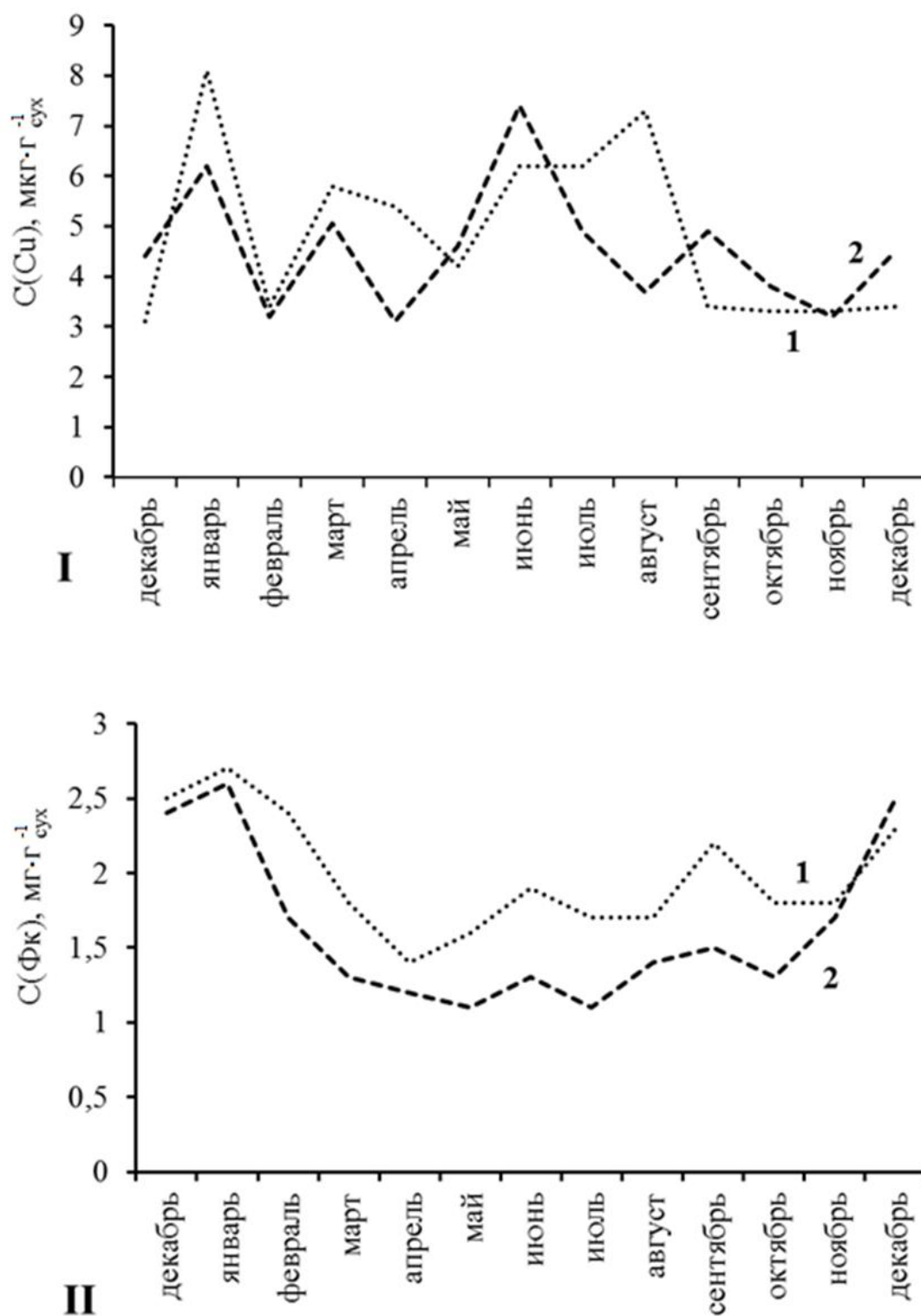


Рисунок 5.12 – Концентрации меди (I) и фукоксантина (II) в *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) из Карантинной бухты

5.4 Определение зависимости между содержанием фукоксантина и цинка в водорослях

Динамика изменений концентрации цинка формирует устойчивый тренд, отображающий четкую сезонную зависимость (Рисунок 5.13). Для водорослей из обеих локаций отмечено наличие минимума концентраций Zn в весенний период. Подобная характеристика изменения концентраций в зависимости от сезона совпадает с периодом активного роста бурых водорослей.

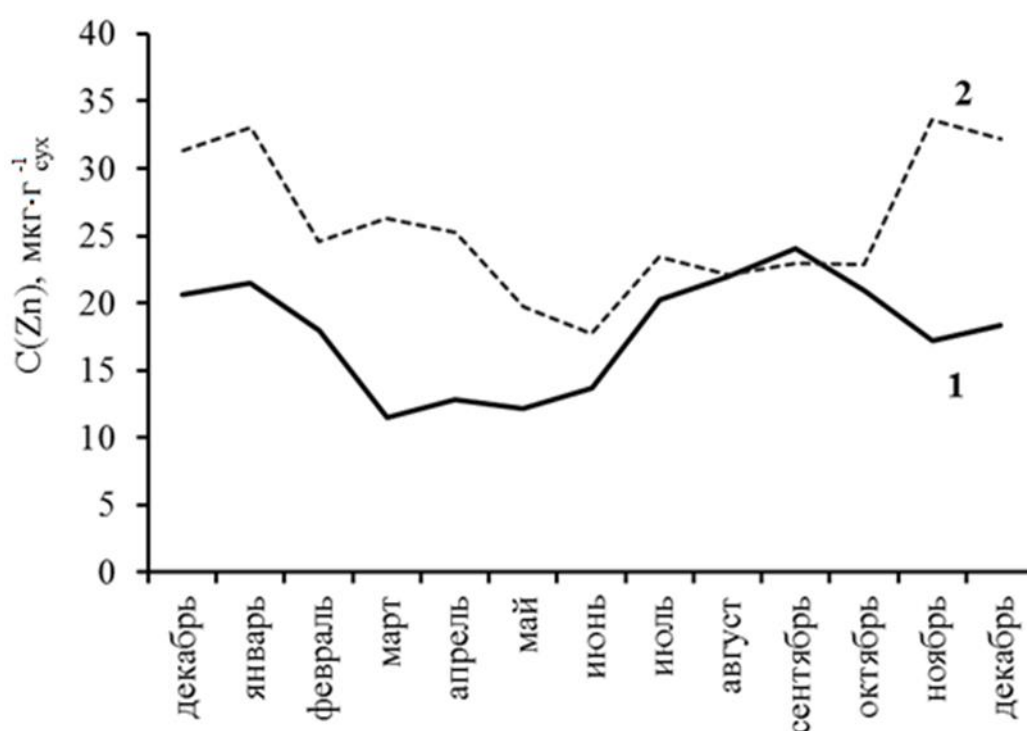


Рисунок 5.13 – Средние значения концентрации цинка в цистозирах: 1 – из акватории Фороса; 2 – из Карантинной бухты

В целом, концентрация Zn в водорослях из Карантинной бухты в среднем на 5-7 $\text{мкг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$ выше, чем для макрофитов из акватории Фороса. Данный факт соответствует экологическому статусу мест отбора проб по уровню антропогенной нагрузки. Направленность сезонных изменений содержания цинка и фукоксантина в цистозирах имеет сходный и синхронный характер (рисунки 5.14 и 5.15).

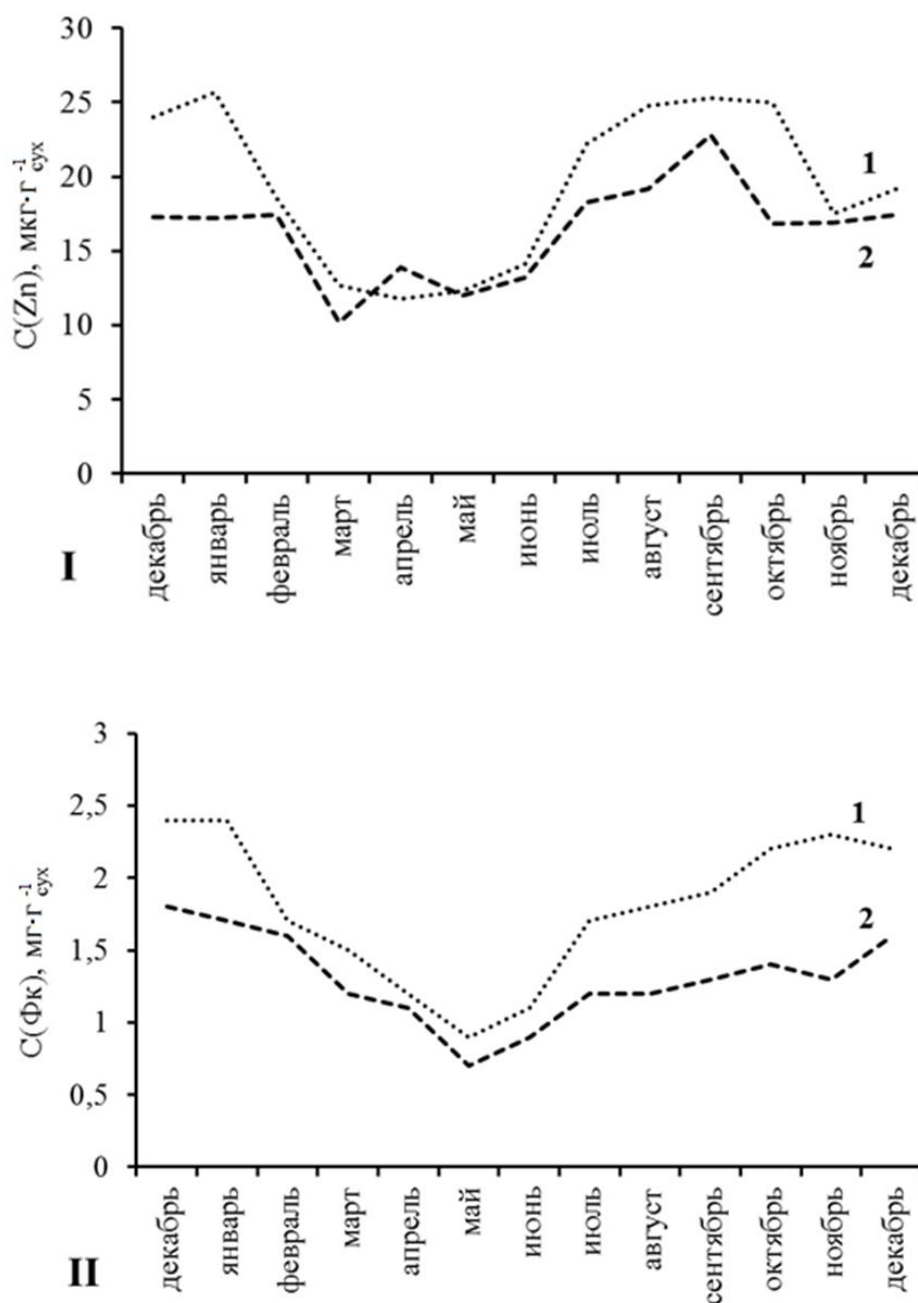


Рисунок 5.14 – Концентрации цинка (I) и фукоксантина (II) в *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) из акватории Фороса

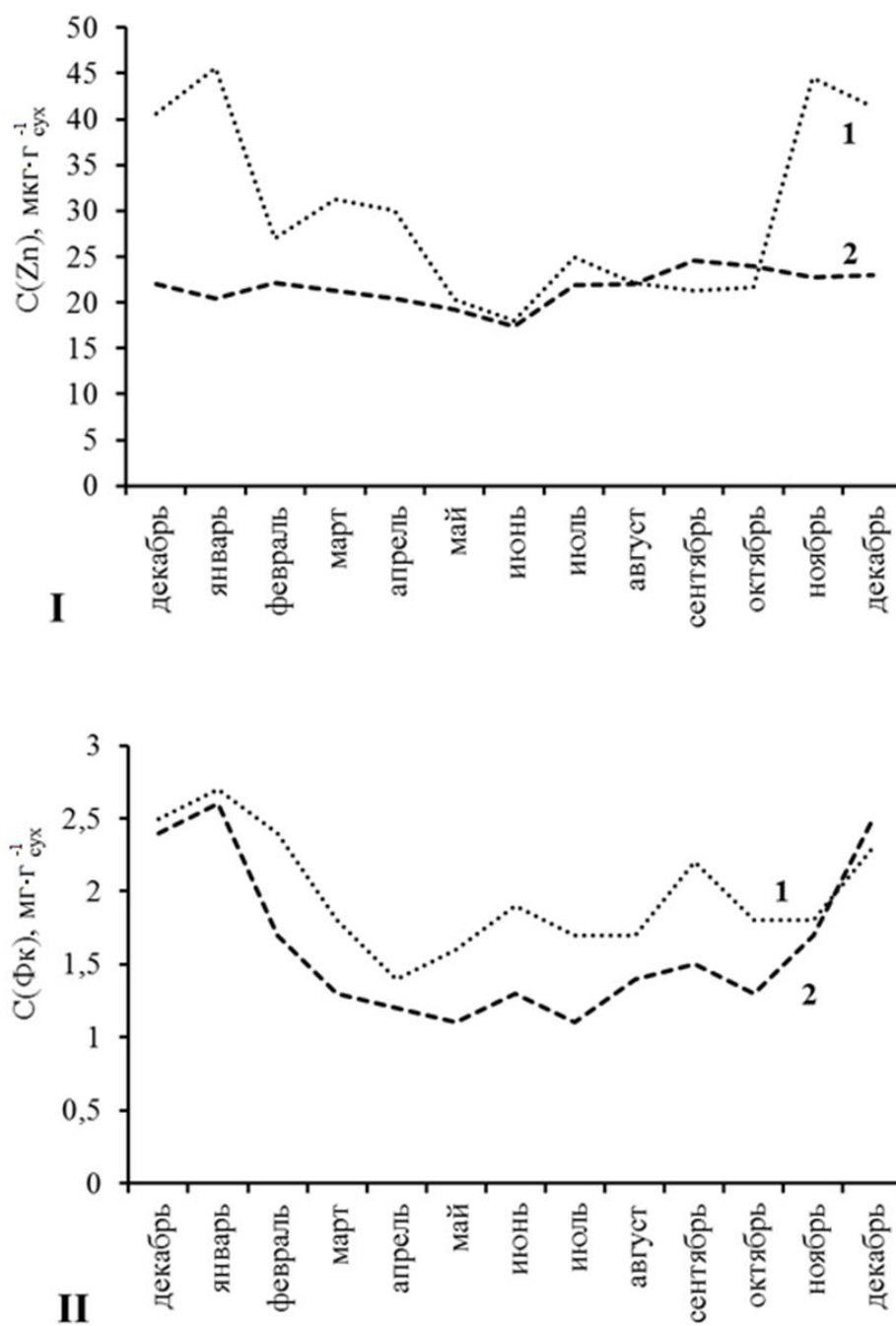


Рисунок 5.15 – Концентрации цинка (I) и фукоксантина (II) в *Cystoseira barbata* (1) и *C. crinita* (2) из Карантинной бухты

Особенно это присуще для водорослей из акватории Фороса. Для проб макрофитов, отобранных в Карантинной бухте, характерно разнообразие концентраций Zn. У *C. barbata* наблюдали высокую динамику изменения содержания Zn с максимумом в зимний период (ноябрь-январь), а для *C. crinita*, напротив, отмечено равномерное распределение концентрации Zn во всем временном диапазоне. В целом, для обеих акваторий концентрация и Zn и Фк выше у *C. barbata*, чем у *C. crinita*. На Рисунке 5.16 показана корреляция между содержанием фукоксантина и цинка в цистозирах из акватории Фороса. Аналогичная картина отмечена в *C. barbata* из акватории Карантинной бухты, однако, в ветвях *C. crinita* из той же станции отбора проб положительной корреляции между цинком и фукоксантина найдено не было (Рисунок 5.17).

5.5 Взаимосвязь содержания фукоксантина, цинка и свинца в бурых водорослях рода *Cystoseira*

Для большинства живых организмов свинец и его производные выступают в роли активных окислителей, которые являются стрессирующими агентами [261]. Воздействие окислителей подобного рода приводит к образованию реактивных форм кислорода, которые инициируют оксидативный стресс клеток. У многих растений, в том числе и водорослей, имеются соответствующие системы понижения активности реактивных форм кислорода, которые подразумевают генерацию антиоксидантов – веществ, подавляющих свободные радикалы в среде клетки.

Подобная система имеется у *C. barbata* и *C. crinita* – биосинтезируемый антиоксидант фукоксантин, который способен восстанавливать или хелатировать активные формы окисляющих агентов. В данном случае – свинец и его производные. Накопление свинца в тканях растений приводит к нарушению процессов фотосинтеза ввиду разрушения гем-содержащих белков, которые принимают участие в процессах переноса электронов [147].

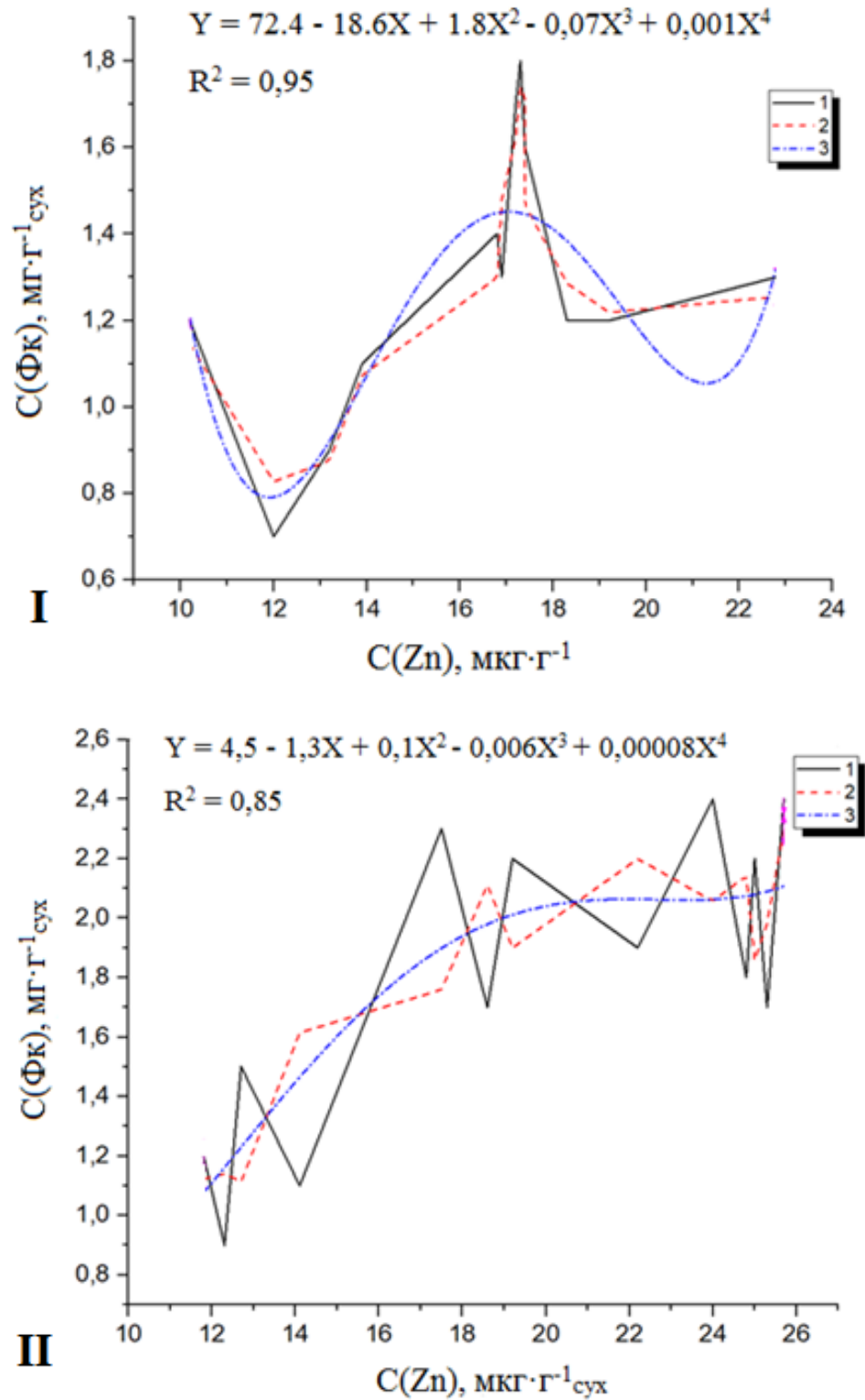


Рисунок 5.16 – Связь между концентрацией цинка и фукоксантина в 2-3 мес. ветвях *C. crinita* (I) и *C. barbata* (II) из акватории Фороса: 1 – исходное соотношение концентраций цинка и фукоксантина; 2 – сглаженные показатели методом Савицкого-Голея; 3 – промоделированная зависимость на основе полиномиальной аппроксимации

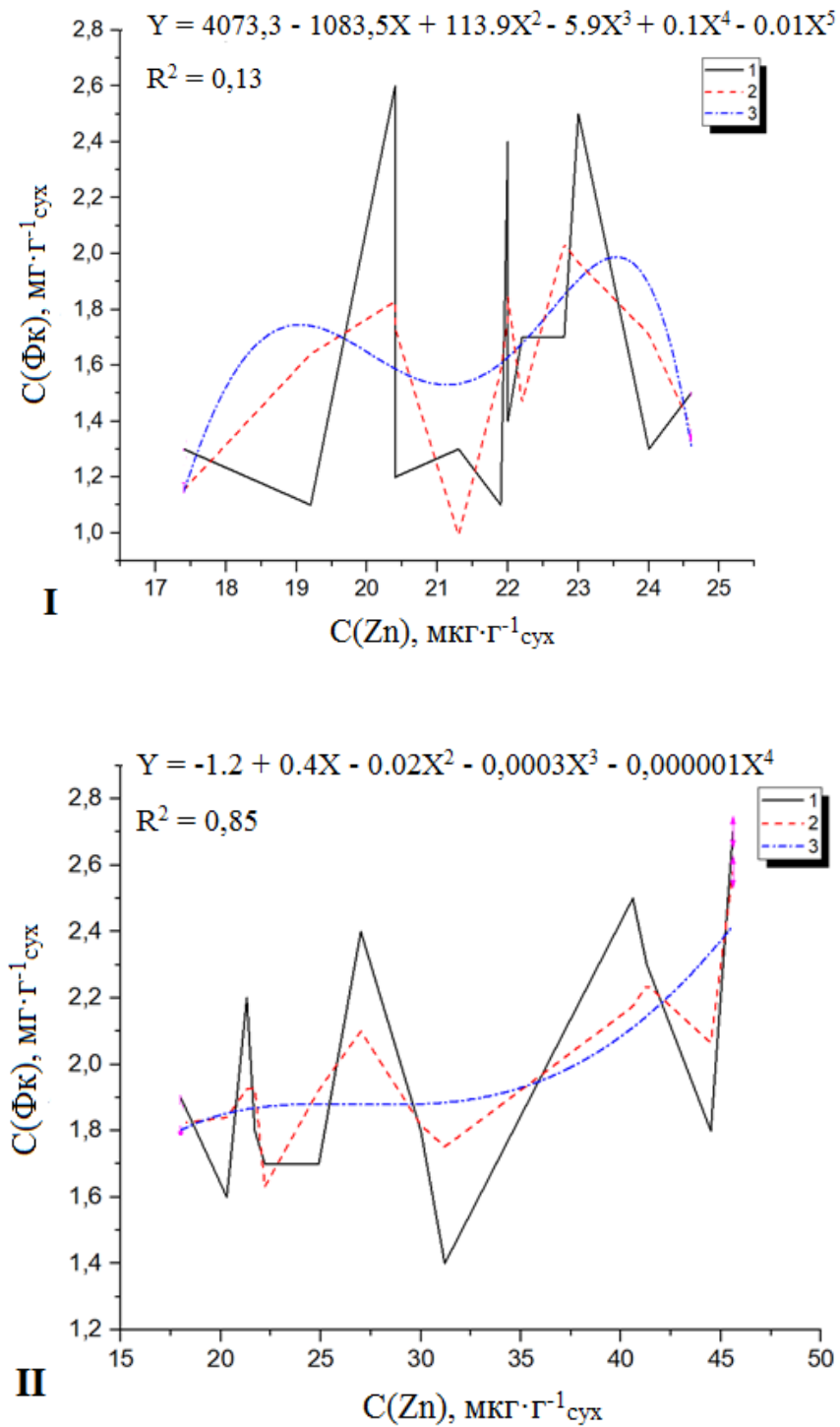


Рисунок 5.17 – Связь между концентрацией цинка и фукоксантина в 2-3 мес. ветвях *C. crinita* (I) и *C. barbata* (II) из акватории Карантинной бухты: 1 – исходное соотношение концентраций цинка и фукоксантина; 2 – сглаженные показатели методом Савицкого-Голея; 3 – промоделированная зависимость на основе полиномиальной аппроксимации

Фк выступает в роли компонента защитной системы клеток водорослей от оксидативного стресса. Таким образом, наблюдаемое противофазное изменение концентраций фукоксантина и свинца свидетельствует об его использовании в качестве компонента нивелирования окислительных свойств свинца в тканях цистозир. В поддержку данной гипотезы говорит ряд научных источников [233],

Цинк можно рассматривать как одного из «двойных» агентов. Данный элемент имеет критически важное значение для многих живых организмов, так как именно цинк участвует в фолдинге большинства белков [109]. У растений же Zn может участвовать и в процессах антиоксидантной защиты [237]. Примером может послужить белок супероксиддисмутаза, который может включать в себя цинк, медь или железо в зависимости от вида растения. Для водорослей – цинк и медь [233]. В морских водорослях Zn может выступать в роли катализатора фотоиндуцированного трансфера электронов, что позволяет повысить эффективность использования энергии квантов света [256].

Ряд исследований показали, что фукоксантин выполняет роль агента, стабилизирующего взаимодействие хлорофилла с активным оксидом цинка. Таким образом, формируется система, в которой стабилизированный фукоксантином оксид цинка поглощает УФ-излучение с испусканием светового излучения в области 533 нм (зелёная полоса свечения) [64, 240]. Данный факт позволяет предположить, что системы, использующие цинк и Фк, несут в себе функцию повышения эффективности улавливания спектра солнечных лучей, а именно – его ультрафиолетовой области [64, 268]. Стоит отметить, что помимо концентраций цинка, Фк коррелирует также и с уровнем УФ-излучения. Таким образом, можно сделать вывод о том, что Фк и цинк являются компонентами фотосинтетической и антиоксидантной систем водорослей *C. crinita* и *C. barbata*.

В целом, полученные данные подтверждают первоначальное предположение, что выбранные для исследования два участка Крымского побережья Чёрного моря имеют разные уровни загрязнённости морской среды: условно чистая акватория (пгт Форос, южный берег Крыма) и более загрязнённая Карантинная бухта г. Севастополя. Известно, что содержание некоторых тяжелых

металлов в грунтах может характеризовать уровень антропогенной нагрузки на прибрежные морские акватории. В донных отложениях Карантинной бухты концентрации цинка и меди в два раза выше, чем в Форосе. Также концентрация цинка, меди и, в меньшей степени, свинца в водорослях из Карантинной бухты выше, чем у макрофитов из акватории пгт Форос.

Кроме этого, Карантинная бухта и акватория Фороса характеризуются разной трофностью вод. В настоящее время оценку экологического состояния морской среды часто проводят с помощью индекса эвтрофикации E-TRIX, который определяют по формуле [284]:

$$E-TRIX = \lg ([Chl\ a] \times [D\%O_2] \times [PT] \times [DIN] \times 1,5) / 1,2 ,$$

где Chla – хлорофилл а в воде, $мкг \cdot л^{-1}$;

$D\%O_2$ – отклонение растворенного кислорода от 100 % насыщения в абсолютных значениях;

PT – общий фосфор, $мкг \cdot л^{-1}$;

DIN – растворенная форма суммы минерального азота, $мкг \cdot л^{-1}$.

Качество морских вод в зависимости от индекса эвтрофикации классифицируют как имеющие низкий трофический уровень при значениях менее 4; средний – при 4-5; высокий – при 5-6 и очень высокий – при 6-10. По этому критерию воды некоторые бухты Крыма характеризуются высоким содержанием биогенных веществ, низкой прозрачностью и возможностью возникновения гипоксии в придонных слоях [143]. При значениях индекса эвтрофикации E-TRIX менее 4 концентрации биогенных элементов невысокие, воды хорошо аэрированы по всей толще и имеют повышенную прозрачность. По результатам исследований в Карантинной бухте значения индекса эвтрофикации в течение 20 мес. изменялись от 2,42 до 4,18, а в условно чистой воде – от 1,40 до 2,88. Более высокие значения индекса наблюдали в летнее время года с максимумом в июле, пониженные – отмечены в другие сезоны с минимумом в октябре. Значения индекса эвтрофикации в относительно чистой воде значительно ниже 4,0, что позволяет

рассматривать воды крымского побережья Чёрного моря вне бухт, как имеющие низкий трофический уровень.

Таким образом, полученные данные показывают, что места отбора проб соответствуют следующему экологическому статусу: Карантинная бухта испытывает постоянную повышенную антропогенную нагрузку по сравнению с акваторией у пгт Форос.

Заключение. Установлено, что для обоих видов цистозир минимальная концентрация фукоксантина соответствует максимальным концентрациям свинца независимо от места отбора проб. При снижении концентрации свинца отмечен соответствующий рост концентрации пигмента. В целом, концентрация Фк у *C. barbata* из Карантинной бухте выше, чем у *C. crinita*, что опять же совпадает со статусом акватории с повышенной антропогенной нагрузкой. Можно предположить, что различная концентрация свинца напрямую влияет на изменение концентрации Фк. Вероятно, фукоксантин включён в систему биорегуляции уровня свинца в макрофитах. Корреляция между содержанием меди и Фк не отмечена; эти показатели изменяются независимо друг от друга. Совместный анализ содержания цинка и фукоксантина в цистозирах показал, что эти показатели сопряжены между собой. Известно, что помимо цинка, Фк коррелирует также и с интенсивностью света. Можно предположить, что фукоксантин и цинк являются компонентами фотосинтетической и антиоксидантной систем бурых водорослей.

ГЛАВА 6 БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ РОДА *CYSTOSEIRA*

Бурые водоросли, в т.ч. и фукусовые, являются ценным сырьем для получения моносахаридов (маннит) и полисахаридов (альгинатов, фукоидана), а также богатым источником такого ценного химического элемента, как йод. Также бурые водоросли содержат целый спектр ценных биологически активных веществ: липиды, в составе которых полиненасыщенные жирные кислоты омега-3 и пигменты, различные макро- и микроэлементы, фитогормоны, витамины, причем концентрация последних в 100-1000 раз выше, чем в наземных растениях [19, 32].

Несмотря на столь широкий спектр БАВ в бурых водорослях, задачи данной работы ограничены анализом содержания фукоксантина, липидов и состава жирных кислот в водорослях рода *Cystoseira* C. Agardh, обитающих в Чёрном море.

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), особенно омега-3 ЖК и каротиноид фукоксантин, найденные в бурых водорослях, оказывают положительное влияние на здоровье человека [93, 115]. Установлено, что Фк принимает участие в метаболизме ПНЖК. Так, Фк увеличивает количество докозагексаеновой (цервоновой) и арахидоновой кислот в печени мышей КК-Ау (с ожирением и диабетом), тогда как уровень цервоновой кислоты в тонком кишечнике остается неизменным, что указывает на то, что Фк может модифицировать метаболические пути ПНЖК ω -3 и ω -6 [275]. Показано, что уровни докозагексаеновой и арахидоновой кислот в липидах печени мышей КК-Ау при употреблении липидов бурых водорослей значительно увеличились [62]. Фукоксантин увеличивает окисление жирных кислот и снижает содержание липидов в печени, регулируя активность метаболических ферментов и стимулируя активность β -окисления [289].

Главный ресурс n-3 ПНЖК – морская рыба, однако, учитывая сокращение запасов рыбы, необходим поиск новых источников ПНЖК. Существует много исследований по содержанию Фк и ЖК в бурых водорослях, в том числе цистозирах, из разных мест обитания [116, 169, 181, 230, 259, 266, 264, 272, 282].

Однако данные по синхронным измерениям концентрации этих соединений в разновозрастных морфоструктурных элементах бурых водорослей рода *Cystoseira* отсутствуют. Также возник вопрос, есть ли подобная биологическая функция Фк в цистозирах и есть ли корреляция между содержанием Фк и ЖК в бурых водорослях. Поэтому цель данного исследования – определить содержание липидов, Фк и состав жирных кислот в ветвях *C. barbata*.

6.1 Концентрация липидов и фукоксантина в разновозрастных ветвях *C. barbata*

Хотя содержание липидов в бурых водорослях достаточно невысокое (менее $4 \text{ г} \cdot 100 \text{ г}^{-1}_{\text{сух}}$), липидная фракция включает в себя такие важные БАВ, как n-3 ПНЖК и фукоксантин [62]. Содержание липидов и Фк в *C. barbata* в весенне-летний период имеет достаточно низкие значения (Рисунок 6.1). Максимальная концентрация липидов ($7,8 \pm 0,3 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$) отмечена в ветвях III возрастной группы. Известно, что на содержание липидов в макрофитах влияют многие факторы, такие как свет, температура, место обитания и время отбора проб водорослей. Так, *U. pinnatifida* из Японского моря, собранная в разные месяцы, содержала разные концентрации липидов, в летний период меньшие, чем в зимний [139].

Отметим высокую концентрацию Фк в III возрастной группе *C. barbata* ($0,59 \pm 0,04 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}_{\text{сух}}$). Полученные результаты совпадают с литературными данными для *U. pinnatifida* [96], где показано, что концентрация пигмента в макрофитах в зимний период незначительно выше в молодых ветвях, чем в старых. В весенний период в молодых ветвях концентрация Фк немного меньше, а летом – содержание Фк в два раза выше в молодых ветвях. Таким образом, сезонность влияет на распределение Фк в разновозрастных ветвях бурых водорослей, что также подтверждено ранее полученными нами данными (см. Главу 4).

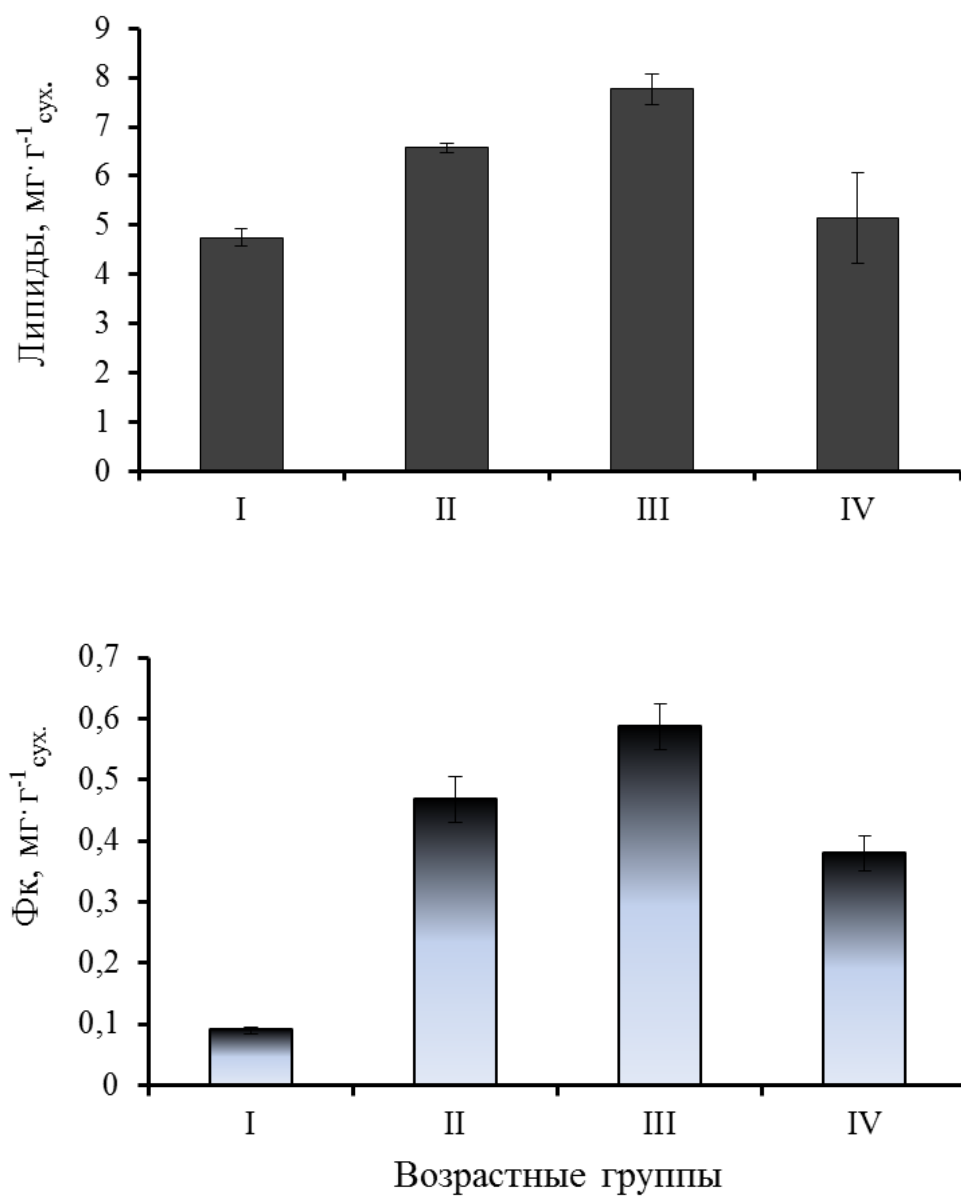


Рисунок 6.1 – Концентрация липидов и Фк в *C. barbata*. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес.

6.2 Состав жирных кислот ветвей *C. barbata*

Доступность важных ПНЖК, таких как линолевая, гамма-линолевая, арахидоновая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая, дает возможность применения их в составе биомедицинских препаратов [193]. В бурых водорослях в наибольшем количестве содержатся миристиновая (C14:0), олеиновая (C18:1(n-9)), пальмитиновая (C16:0), стеарионовая (C18:0), арахидоновая (C20:4(n-6)) и тимнодоновая (C20:5(n-3)) кислоты. Главные ПНЖК в водорослях из теплых вод: C18:1(n-9) и C20:4(n-6); водоросли из холодных вод в наибольших количествах содержат C20:4(n-6) и C20:5(n-3) [130, 266]. В *C. barbata* из Чёрного моря отмечены высокие концентрации C14:0, C16:0, C18:0, C18:1(n-9), C18:2(n-6), C18:4(n-3), C20:4(n-6), C20:5(n-3) (Таблица 6.1).

Таблица 6.1 – Состав жирных кислот липидной фракции в ветвях *C. barbata*

Жирные кислоты	% от общей массы МЭЖК
C14:0	5,46±1,8
C15:0	0,87±0,17
C16:0	21,61±2,0
C16:1(n-7)	2,59
C16:4(n-3)	0,28±0,07
C17:0	0,57±0,1
C18:0	2,35±0,7
C18:1(n-9)	12,40
C18:2(n-6)	3,97±0,9
C18:3(n-6)	0,31
C18:4(n-3)	6,90±1,7
C20:0	0,26±0,07

Жирные кислоты	% от общей массы МЭЖК
C20:2(n-6)	0,2±0,07
C20:3(n-6)	0,92±0,1
C20:4(n-3)	0,68±0,09
C20:4(n-6)	10,63±1,2
C20:5(n-3)	7,11±1,4
C22:6(n-3)	0,37±0,2
C24:0	0,45
Σ ПНЖК	31,4±1,5
Σ НЖК	31,25±1,5
Σ МНЖК	15
n-3/n-6	1,0
Σ п9-ЖК	12,40 %

В *C. barbata* в наибольшем количестве содержится пальмитиновая кислота (C16:0) – 21,6 % общей массы липидов, аналогично другим бурым макрофитам из различных мест обитания. Кроме этого, в небольших количествах содержится миристиновая (C14:0) и в следовых - пентадекановая (C15:0) и гептадекановая (C17:0) кислоты. Концентрации C14:0, C15:0 и C17:0 в *C. barbata* в 2-3 раза выше в сравнении с другими бурыми водорослями [266].

Полученные нами результаты ЖК-состава *C. barbata* согласуются с результатами, полученными для других видов цистозир: *C. nodicaulis*, *C. usneoides*, *C. hakodatensis*, *C. indica*, *C. compressa*, *C. humilis*, *C. osmundacea*, *C. crinita*, *C. abies-marina* из других локаций [169, 181, 230, 259, 282] (Таблица 6.2). В работе [282] концентрация ПНЖК варьировала от 29 % в *C. barbata* до 46 % в *C. compressa*. По нашим данным содержание ПНЖК в *C. barbata* из Чёрного моря составило 32 %.

Среди ПНЖК наиболее распространенная кислота, обнаруженная во всех видах цистозир – арахидоновая (C20:4(n-6)). Для *C. nodicaulis* её содержание колеблется от 12 % до 27 % [282]. По другим данным концентрация арахидоновой кислоты (АК) в *C. nodicaulis* составляет 18 % [259]. ЖК-состав водорослей варьирует в зависимости от вида, места обитания и степени его загрязнения, освещенности и солености [186, 238]. По литературным данным в *C. barbata* концентрация АК варьирует от 15 % до 20 % (Таблица 6.2). По нашим данным в ветвях цистозиры в зависимости от возрастной группы содержание АК изменяется в пределах 7-14 % (Рисунок 6.2).

Таблица 6.2 – Концентрации основных жирных кислот в бурых водорослях рода *Cystoseira*

Жирная кислота	Название кислоты	<i>C. hakodatensis</i>		<i>C. indica</i> [130]	<i>C. barbata</i> [264]
		[272]	[266]		
C14:0	миристиновая	3,4	2,85±0,3	4,23±0,07	5,42
C16:0	пальмитиновая	20,3	18,49±0,3	30,53±0,76	15,28
C16:1(n-7)	пальмитолеиновая	2,8	0,63±0,08	3,79±0,1	-
C18:1(n-9)	олеиновая	11,1	11,08±0,24	11,1±0,06	20,75
C18:2(n-6)	линолевая	7,9	6,95±0,15	4,58±0,14	6,07
C18:3(n-6)	гамма-линолевая	-	1,52±0,03	-	0,83
C18:4(n-3)	стеариδοновая	11,8	14,28±0,46	11,09±0,07	8,41
C20:3(n-6)	ейкозатриеновая	-	0,85±0,02		1,48
C20:4(n-6)	арахидоно́вая	15,2	16,59±0,11	13,81±0,14	15,46
C20:5(n-3)	ейкозапентаено́вая	11,2	12,96±0,18	6,76±0,12	5,64
C22:6(n-3)	цervoно́вая	-	nd	-	-

Жирная кислота	<i>C. barbata</i> [116]	<i>C. crinita</i> [282]	<i>C. humilis</i> [282]	<i>C. compressa</i> [282]	<i>C. barbata</i> [282]	<i>C. nodicaulis</i> [282]
C14:0	0,9	1,4	15,25±1,06	4,34±0,05	8,59±0,10	7,15±0,20
C16:0	23,5	22,4	33,86±0,44	26,47±0,08	35,15±0,61	26,81±0,12
C16:1(n-7)	-	0,6	3,84±0,12	2,74±0,01	4,87±0,21	2,31±0,03
C18:1(n-9)	12,2	10,1	9,24±0,22	17,07±0,06	11,68±0,12	16,44±0,15
C18:2(n-6)	5,2	5,3	17,08±0,41	10,45±0,04	5,31±0,18	8,93±0,03
C18:3(n-6)	8,7	6,4	nd	2,28±0,01	nd	nd
C18:4(n-3)	15,6	17,4	-	-	-	-
C20:3(n-6)	-	-	1,04±0,09	2,35±0,01	1,20±0,12	2,53±0,05
C20:4(n-6)	20,3	19,3	11,71±1,22	20,11±0,05	19,08±0,82	26,51±0,2
C20:5(n-3)	28	14,9	5,58±0,56	10,12±0,05	2,21±0,21	5,06±0,02
C22:6(n-3)	-	-	-	-	-	-

Примечание: nd – не детектируемое значение

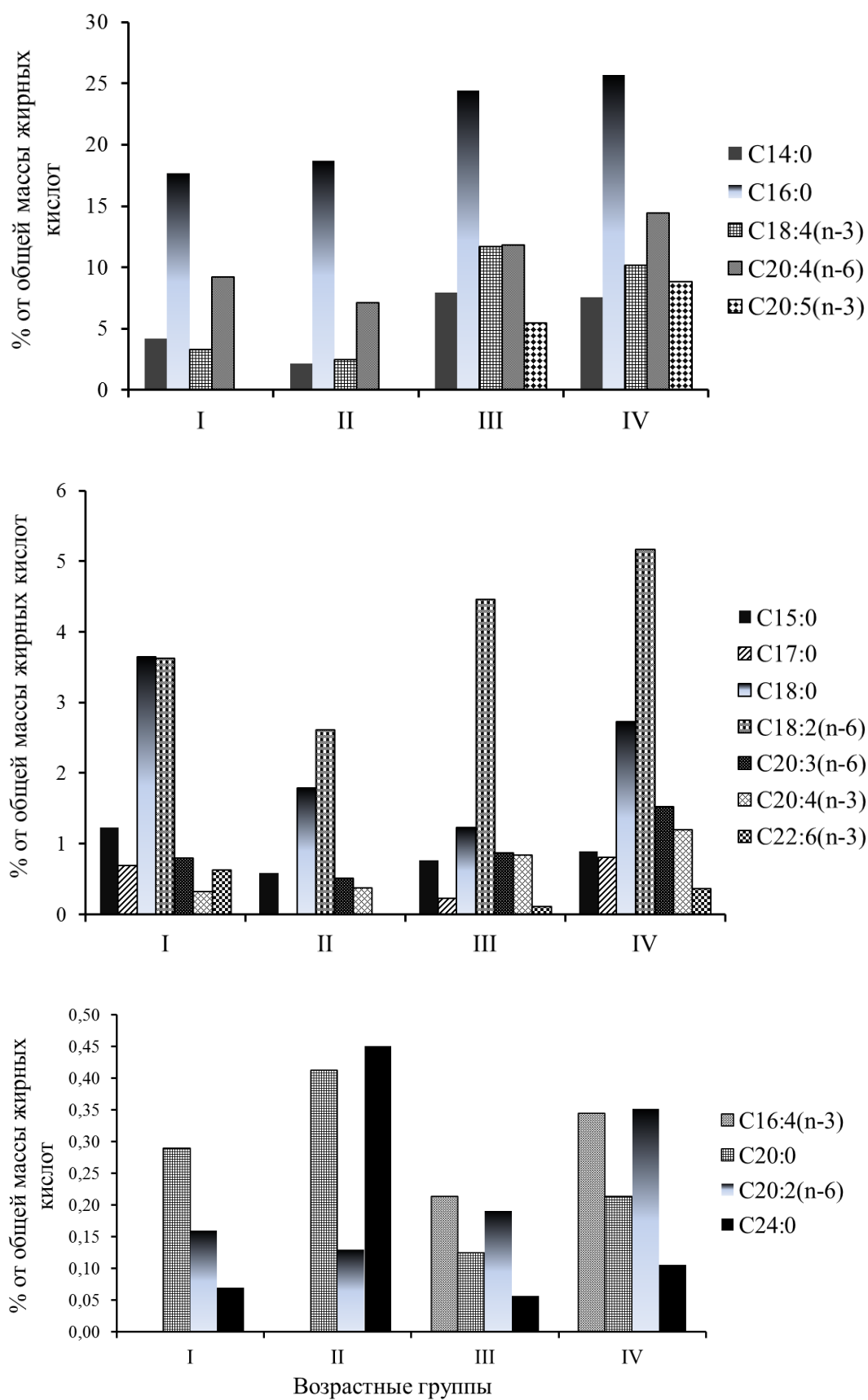


Рисунок 6.2 – Содержание МЭЖК в ветвях *C. barbata*. Возрастные группы ветвей: I – < 1.9 мес., II – $2 \leq 3$ мес., III – $3 \leq 5$ мес., IV – $5 \leq 6$ мес.

Арахидоновая кислота – важная составляющая биомембран, предшественник простагландинов и многих других эйкозаноидов. Арахидоновая и цервоновая (C22:6(n-3)) кислоты являются основными составляющими фосфолипидной мембраны головного мозга, могут действовать как иммуносупрессант и вызывать воспалительные реакции и свертывание крови [255]. Свободная АК и ее метаболиты важны для функции скелетных мышц, нервной и иммунных систем. Независимые от окисления производные АК необходимы для ответных реакций стресса, боли и эмоций [269]. Их недостаток может привести к серьезным проблемам, таким как выпадение волос, жировая дегенерация печени, анемия и снижение фертильности у взрослых.

Показано, что АК способствует снижению коронарного риска и, являясь бедным субстратом для β -окисления, важна для развития и оптимальной работы нервной системы, особенно мозговых и когнитивных функций [269]. Отметим, что n-3 ПНЖК, такая как эйкозапентаеновая кислота (ЭПК), обнаруженная у большинства видов цистозир в относительно высоких концентрациях (5-10 %) [282], конкурирует с линолевой кислотой за преобразование в АК, регулируя, таким образом, соотношение n-3 / n-6 ПНЖК [93]. ЭПК проявляет положительные эффекты при лечении астмы, псориаза, ревматоидном артрите, депрессии, аллергии, сердечно-сосудистых заболеваний и рака. В *C. barbata*, по нашим данным, концентрация ЭПК составила в среднем 7 %, с максимальной концентрацией 9 % в ветвях IV возрастной группы (Таблица 6.1, Рисунок 6.2).

В некоторых видах цистозир: *C. nodicaulis*, *C. tamariscifolia* и *C. usneoides* [230, 259], включая *C. barbata* из нашего исследования, в небольших количествах содержится цервоновая кислота C22:6(n-3) (0,4 %). Эта кислота, в отличие от многих других видов бурых водорослей, не была детектирована ни в одном из 6 видов цистозир в работах [112, 266, 282].

Сумма насыщенных жирных кислот (НЖК) в бурых водорослях варьирует от 18 % общих МЭЖК в *U. pinnatifida* до 41 % в *Laminaria* sp. [266]. По другим данным, концентрация НЖК в *Sargassum horneri* была максимальной среди

исследованных 6 видов бурых водорослей и составила 30 % [272]. По нашим данным содержание НЖК в *C. barbata* достигает 31 % (Таблица 6.1).

Содержание ПНЖК в бурых водорослях варьирует от 39,9 % общего количества метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) в *Laminaria* sp. до 73,7 % в *U. pinnatifida* [112]. По нашим данным в *C. barbata* содержится 32 % ПНЖК (Таблица 6.1). Из них преобладающими являются линолевая, стеарионовая, арахидоновая и эйкозапентаеновая кислоты. Содержание этих кислот в *C. barbata* имеет сходный порядок величин с данными для других бурых водорослей, со сравнительно высоким показателем для арахидоновой кислоты (10,7 % общих липидов). В *Laminaria* sp. и *U. pinnatifida* концентрация арахидоновой кислоты составляет 11,3-14,3 %, в *Hizikia fusiforme* – 5 % [112].

Количество n-3 ЖК в бурых водорослях варьирует от 5,3 % общих МЭЖК в *Undaria pinnatifida* до 18,3 % в *Laminaria* sp. [112]. В *C. barbata* доля n-3 ЖК составила 15,3 % от общего количества МЭЖК. Содержание ЖК сильно зависит от видового состава водорослей и поэтому распределение ЖК для любого вида невозможно легко воспроизвести, так как липидный состав сильно изменяется в зависимости от температуры, интенсивности света, уровня минералов, азотистых соединений и периода жизненного цикла водорослей [112].

Бурые водоросли являются важным источником длинноцепочечных ПНЖК (n-3, n-6), которые необходимы для образования структурных липидов и элементов клеточных мембран. В дополнение, эти кислоты являются прекурсорами эйкозаноидов, которые влияют на процессы воспаления и иммунные реакции [93]. Два класса ПНЖК (n-3, n-6) имеют противоположные функции и их баланс важен для нормального роста и развития организма. Эти ПНЖК полезны для профилактики сердечно-сосудистых и других хронических заболеваний, таких как диабет, гипертония и аутоиммунные заболевания. Рекомендованное соотношение n-3/n-6 для укрепления здоровья человека – от 1:1,5 до 1:2 [150]. Результаты нашего исследования показали, что в *C. barbata* соотношение кислот n-3/n-6 составляет 1,01 и является наиболее приемлемым.

Рыбий жир является основным источником n-3 и n-6 ПНЖК, таких как арахидоновая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая. Однако первоисточник этих кислот – морские водоросли и фитопланктон, которыми питаются рыбы [140]. Потребление продуктов, богатых n-3 ПНЖК, оказывает положительное влияние на липидный состав крови и, следовательно, может использоваться для профилактики атеросклероза [127]. Таким образом, *C. barbata* из Чёрного моря является ценным источником n-3 ЖК, особенно арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот.

6.3 Содержание жирных кислот в разновозрастных ветвях *C. barbata* и их связь с концентрацией фукоксантина

При анализе концентраций МЭЖК в ветвях разных возрастных групп *C. barbata* выявлена следующая тенденция: содержание большинства кислот, в том числе и доминантных – С14:0 (миристиновая), С16:0 (пальмитиновая), С16:4(n-3), С18:2(n-6), С18:4(n-3) (стеариновая), С20:2(n-6), С20:3(n-6) (дигомо-гамма-линолевая), С20:4(n-3), С20:4(n-6) (арахидоновая) и С20:5(n-3), имело максимум в III и IV возрастной группе цистозеры (Рисунок 6.2).

С20:0 (арахиновая) и С24:0 (лигноцериновая) в наибольшем количестве накапливаются в ветвях цистозеры II группы. В отдельную группу можно выделить МЭЖК с максимальной концентрацией в I и IV возрастной группе ветвей: С15:0 (пентадекановая), С17:0 (маргариновая), С18:0 (стеариновая), С22:6(n-3) (цервоновая). Отметим, что среди этих кислот преобладают насыщенные ЖК. Все ПНЖК, за исключением цервоновой кислоты, в максимальных количествах накапливаются в ветвях старше 3 месяцев.

По нашим данным все n-3 ПНЖК накапливаются в старых ветвях III - IV возрастной группы, с максимум в IV. Эти данные согласуются с [183], где более высокие уровни n-3 ПНЖК найдены в базальных частях листьев *Saccharina japonica*, по сравнению с дистальными, из-за особенностей распределения гликолипидов в талломе макрофита. Поскольку более базальные части включают в себя меристемные области, это может указывать на то, что молодые клетки имеют

более низкие уровни омега-3 ПНЖК, по сравнению с более зрелыми клетками, присутствующими в других частях таллома. У фукусовых водорослей *F. serratus* и *H. elongata* также отмечена тенденция к увеличению содержания стеариδοновой кислоты (C18:4(n-3)) от базальных структур к дистальным частям и, в меньшей степени, тимнодоновой (C20:5(n-3)). Стеариδοновая кислота является промежуточным продуктом в конверсии C18:3(n-3) до C20:5(n-3) [285].

Аналогично содержанию Фк и липидов, в III группе отмечена высокая концентрация большинства МЭЖК. Структурно ветви макрофитов характеризуются гораздо большей плотностью стопок тилакоидов и митохондриальных крист на единицу объема, чем в стволах. Как жирные кислоты, так и каротиноиды играют важную роль в структурной целостности тилакоидной мембраны хлоропласта [134, 154, 233]. Большая часть липидов в морских водорослях присутствует в виде гликолипидов, которые преимущественно расположены в фотосинтетических мембранах [144]. Гликолипиды обычно богаты омега-3 жирными кислотами C18:4(n-3) и C20:5(n-3), которые участвуют в образовании тилакоидной мембраны [182].

Исследование на наземных растениях выявили сильную вариабельность внутри таллома по содержанию жирных кислот, а также профилей, связанных с фотосинтетическими структурами. В том же исследовании было показано значительное увеличение C18:4(n-3) в фотосинтезирующих листьях большинства исследованных морских водорослей по сравнению с другими структурами [114].

У *S. barbata* концентрация C18:4(n-3) и C20:5(n-3) также коррелирует с содержанием фукоксантина (рисунки 6.1 и 6.2), однако во II группе ветвей, где найдена такая же высокая концентрация Фк, как и в IV – эти МЭЖК не были детектированы. Во II группе ветвей концентрация липидов и Фк высокая, выше только в III группе, а содержание практически всех МЭЖК, за исключением насыщенных арахидоновой (C20:0) и лигноцеридиновой (C24:0), минимальное.

Сравнительный анализ общего количества ПНЖК и НЖК, n-3 и n-6 кислот показал, что максимальное содержание всех групп кислот обнаружено в старых

ветвях IV группы, а оптимальное соотношение п-3/п-6 кислот характерно для III возрастной группы (Таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Группы МЭЖК в разновозрастных ветвях *C. barbata*

Группы МЭЖК	% от общей массы МЭЖК			
	возрастные группы ветвей			
	I	II	III	IV
ПНЖК	18,39	13,20	35,64	42,35
НЖК	28,06	24,03	34,89	38,00
п-3	4,25	2,84	18,27	20,84
п-6	14,06	10,36	17,35	21,51
п-3/п-6	0,3	0,27	1,05	0,97

Из полученных результатов следует, что при использовании морских водорослей в качестве пищевых ингредиентов можно учитывать распределения концентраций МЭЖК и Фк в талломе макрофита. Для сбора могут быть выбраны определенные части таллома, в больших концентрациях содержащие необходимые соединения.

6.4 Получение профилактического продукта, содержащего фукоксантин, из бурых водорослей рода *Cystoseira*

Как было показано ранее, биологически активное вещество фукоксантин имеет антиоксидантное, цитостатическое, гипотензивное и антидиабетическое действие [214, 243]. Фк проявляет активность при профилактике раковых заболеваний [164], а также его используют в качестве терапевтического агента для лечения и профилактики злокачественных образований, связанных с вирусами [36]. Фк, экстрагированный из бурой водоросли *Undaria pinnatifida*, проявил активность в профилактике и лечении рака печени. Пигмент используют в борьбе с ожирением, и он обладает противовоспалительным действием [203]. Прием фукоксантина в

количестве 0,6 ммоль или 5 г водоросли в день оказывает профилактическое действие против раковых заболеваний и позволяет бороться с ожирением. В настоящее время разработано ряд технологий переработки бурых водорослей с целью получения различных лечебно-профилактических добавок и БАД. Выше нами показано, что бурые водоросли рода *Cystoseira* содержат достаточное количество Фк для его выделения. Достаточно высокая общая биомасса этих водорослей в Чёрном море делает их перспективным объектом для промышленного использования.

Известные ранее способы переработки бурых водорослей содержат недостатки, основными из которых являются применение дорогостоящих не пищевых растворителей, продолжительность и трудоемкость процесса экстракции Фк [36] или же использование в качестве сырья высушенной водоросли, которая содержит лишь 50 % исходной концентрации Фк [37].

Поэтому нами разработан и запатентован способ получения профилактического продукта из водорослей рода *Cystoseira*, содержащего значительное количество фукоксантина и пригодного к использованию в виде БАД [38]. В качестве прототипа выбран способ получения лечебно-профилактического продукта из цистозир [37], где высушенные водоросли заливают 96 % этиловым спиртом в соотношении 1 : 1. Недостаток этого способа заключается в том, что при заливке высушенной водоросли цистозир теряется до 50 % Фк, кроме того, процесс получения продукта достаточно длительный и громоздкий.

В результате предложенного способа разработана усовершенствованная технология выделения фукоксантина из черноморских бурых водорослей рода *Cystoseira*. Техническим результатом способа является повышение концентрации Фк в конечном продукте и упрощение технологии вследствие учёта особенности используемого сырья. Для получения лечебно-профилактического продукта можно использовать как свежесобранные макрофиты, так и водоросли после штормовых выбросов. У свежесобранной водоросли сырьем служит весь таллом. Продукт также можно получать из штормовых выбросов. В этом случае они не должны находиться под прямыми солнечными лучами, и быть собранными не позже, чем

через 5-7 час после шторма. Ранее было установлено, что концентрация фукоксантина в ветвях цистозеры возрастом 2-3 мес. в 1,5-2 раза выше, чем талломе макрофита [242]. Однако сбор ветвей цистозеры возрастом 2-3 мес. является процессом достаточно сложным и требующим значительных временных затрат.

Таким образом, новым в предлагаемом способе является то, что в технологии учтены условия сбора водоросли, а также возрастные особенности цистозеры. В этом случае можно получать повышенную концентрацию фукоксантина в готовом продукте. Значения количественных параметров способа, режимы и условия экстрагирования установлены экспериментально в оптимальных границах достижения технического результата.

На основе полученных нами данных о концентрации Фк в разновозрастных ветвях цистозер можно сделать некоторые выводы о наиболее эффективном сборе сырья, а также экстракции пигмента с максимальной эффективностью. Способ получения профилактического продукта из водорослей рода *Cystoseira* включает одно- или двухступенчатую спиртовую экстракцию свежесобранных (1-2 часа после сбора) водорослей, а также макрофитов после штормовых выбросов (собранных в течение 6 часов после шторма в не солнечный день), 96 % этиловым спиртом в течение 4-5 часов в соотношении 1:3 с получением экстракта. Экстракт заливают дистиллированной водой в соотношении 3:2, а через 24 ч выпавший осадок отфильтровывают и растворяют в этиловом спирте в соотношении 1:1. В результате получаем препарат с содержанием Фк до 5%.

Приведем два примера получения конечного продукта из свежесобранной цистозеры и из штормовых выбросов.

Пример 1. Свежесобранную цистозеру (1-2 ч после сбора) предварительно промывали дистиллированной водой для удаления песка, солей и эпифитов и высушивали между листами фильтровальной бумаги. Ветви возрастом 2-3 мес. измельченных до размера 0,5-1 см. К 100 г ветвей добавляли 300 мл 96 % этилового спирта при комнатной температуре, через 5 ч экстракт сливали и добавляли новую порцию спирта (200 мл). Через 4-5 часов экстракты объединяли (общий объем

экстракта 450 мл), добавляли 300 мл дистиллированной воды. Через 24 ч выпавший осадок отфильтровывали, растворяли в этиловом спирте в соотношении 1:1 по массе и получали спиртовой продукт (50 мл) с содержанием фукоксантина около 65 мг на 100 г сырой массы водоросли.

Пример 2. Поскольку под действием солнечных лучей в бурых водорослях идет интенсивное разрушение фукоксантина, то штормовые выбросы цистозиры собирали в пасмурный день в течение 6 ч после шторма, промывали 2 раза дистиллированной водой для освобождения от песка, солей и эпифитов. Один кг сырья экстрагировали в течение 4-5 часов 3 л 96 % этилового спирта. Экстракцию проводили при температуре 35-40°C. Далее водоросли удаляли и к полученному экстракту (около 2,8 л) добавляли 2 л дистиллированной воды. Через 24 ч выпавший осадок отфильтровывали и растворяли в этиловом спирте в соотношении 1 : 1 по массе. Содержание фукоксантина в конечном продукте (80 мл) составило 30-50 мг на 100 г сырой массы водоросли.

Таким образом, из бурых водорослей рода *Cystoseira* получен профилактический продукт, содержащий Фк, и представляющий собой жидкость темно-красного цвета с характерным запахом водоросли цистозиры, и готовый к употреблению. Полученный спиртовой экстракт также обогащен хлорофиллами, полифенольными соединениями, макро- и микроэлементами, в том числе и йодом.

Заключение. Максимальные концентрации липидов и фукоксантина обнаружены в ветвях цистозиры *C. barbata* возрастом 3-5 месяцев. В водоросли отмечены высокие концентрации C14:0, C16:0, C18:0, C18:1(n-9), C18:2(n-6), C18:4(n-3), C20:4(n-6), C20:5(n-3). Содержание арахидоновой кислоты в цистозире варьировало в пределах 7-14 % в зависимости от возраста ветвей. Концентрация эйкозапентаеновой кислоты составила в среднем 7 %, с максимальной концентрацией 9 % в ветвях IV возрастной группы. Содержание насыщенных жирных кислот в *C. barbata* имело сравнительно высокий показатель и составило 31 %. В цистозире в небольших количествах найдена докозагексаеновая кислота C22:6(n-3) ($0,37 \pm 0,2$ %). Максимальная концентрация ПНЖК (36–42 %) обнаружена в ветвях старше 3 мес. Доля наиболее ценных n-3 ЖК составила в

среднем 15,3 % общего количества метиловых эфиров ЖК. Установлено, что цистозира имеет оптимальное для здоровья человека соотношение n-3/n-6 ПНЖК – 1,0. Разработана новая технология получения из бурых водорослей рода *Cystoseira* продукта, содержащего фукоксантин в концентрации до 5 %. Для получения лечебно-профилактического продукта можно использовать как свежесобранные макрофиты, так и водоросли из штормовых выбросов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных источников показал, что данные о концентрации фукоксантина (Фк) в бурых водорослях из Чёрного моря представлены эпизодически. Лишь в одном исследовании, выполненном в середине прошлого столетия, приведены сведения о содержании суммы ксантофиллов (фукоксантин, виолаксантин и неофукоксантин-А) в *Cystoseira barbata*. Также отсутствует сравнительная характеристика содержания важных микроэлементов и фукоксантина в водорослях. Отсутствуют какие-либо данные об антропогенном влиянии на содержание пигмента в бурых водорослях рода *Cystoseira*. Поэтому данное диссертационное исследование было направлено на установление новых закономерностей при изучении содержания фукоксантина в бурых водорослях *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh и *Cystoseira crinita* Duby, находящихся под воздействием природных и антропогенных факторов.

Исследования показали, что содержание Фк варьирует в различных морских водорослях и является видоспецифичным. Установлено, что независимо от места отбора проб, содержание Фк в ветвях *C. barbata* выше, чем в *C. crinita*. Вероятно, это связано с тем, что *C. barbata* обитает в относительно закрытых участках моря и бухтах. Концентрация Фк в ветвях цистозир из относительно загрязненной бухты выше, чем концентрация пигмента в макрофитах, обитающих в открытой части моря. У водорослей рода *Cystoseira* содержание пигмента в стволах значительно ниже, чем в ветвях, а максимальная концентрация Фк обнаружена в ветвях возрастной группы от 2 до 3 мес.

Максимальные концентрации макро- и микроэлементов в большинстве случаев также найдены в молодых ветвях водорослей, что, вероятно, связано с интенсивным метаболизмом растений в процессе роста. Годовая динамика содержания Фк у цистозир имеет хорошо выраженные периоды максимума и минимума. Пик концентрации Фк приходится на осенне-зимний период. Минимальные значения пигмента отмечены в весенне-летний период при максимальной температуре и освещенности. В динамике изменения концентрации

Фк у цистозир наблюдается синхронное снижение уровня пигмента с ростом интенсивности общего светового потока.

Бурые водоросли является хорошим биоиндикатором загрязнения прибрежных вод тяжелыми металлами и др. элементами. Использование для этих целей морфологических структур цистозеры – ветвей, имеющих небольшой жизненный цикл (7 мес.), дают возможность проводить мониторинг загрязнения акваторий за относительно кратковременный промежуток времени. В наибольшей степени для этого подходят данные по накопления большинства элементов в ветвях цистозеры возрастом 2 - 3 мес. Дальнейшие исследования содержания макро- и микроэлементов в организмах-биоиндикаторах, а также в воде и грунте позволят охарактеризовать степень загрязнения морской среды различными элементами антропогенного происхождения.

Максимальные концентрации липидов и фукоксантина обнаружены в ветвях цистозеры *C. barbata* возрастом 3-5 месяцев. Максимальная концентрация полиненасыщенных жирных кислот обнаружена в ветвях старше 3 мес. Установлено, что цистозера имеет оптимальное для здоровья человека соотношение n-3/n-6 ПНЖК – 1,0. Разработана новая технология получения из бурых водорослей рода *Cystoseira* продукта, содержащего фукоксантин в концентрации до 5 %. Для получения лечебно-профилактического продукта можно использовать как свежесобранные макрофиты, так и водоросли из штормовых выбросов.

Известно, что фукоксантин проявляет высокую терапевтическую активность, включая противовоспалительный, гипотензивный, противораковый и другие эффекты. Поэтому новые данные о содержании фукоксантина и полиненасыщенных жирных кислот в макрофитах рода *Cystoseira* показывают возможность использования этих бурых водорослей как сырья для получения биологически активных веществ.

ВЫВОДЫ

1. Годовая динамика содержания фукоксантина у бурых водорослей рода *Cystoseira* имеет хорошо выраженные периоды максимума и минимума. Пик концентрации фукоксантина приходится на осенне-зимний сезон. Минимальные значения пигмента отмечены в весенне-летний период при максимальной температуре и освещённости воды.

2. Установлено, что содержание фукоксантина в ветвях *C. barbata* достоверно выше, чем в ветвях *C. crinita*. Максимальная концентрация фукоксантина обнаружена в ветвях цистозир возрастной группы от 2 до 3 мес.

3. Впервые изучена годовая динамика синхронного изменения содержания фукоксантина, цинка и свинца в ветвях цистозир в акваториях Чёрного моря с разной антропогенной нагрузкой. Более высокое содержание фукоксантина и цинка отмечено в водорослях из эвтрофированной Карантинной бухты, по сравнению с менее загрязнённой акваторией Фороса. Минимальная концентрация фукоксантина соответствует максимальным концентрациям свинца независимо от места отбора проб водорослей.

4. Выявлено, что средние концентрации макро- и микроэлементов в ветвях *C. barbata* по степени убывания составляют следующий ряд: $Al > Br > Si > Sr > P > Fe > La > F > Ba > As > Zn > Rb > Y > Mn > Ni > Cu > Bi > Pb > W > Cr > Se > Zr > V > Ti > Cd > Hg > Ga > U > Sb > Th > Ge > Be$. Максимальные концентрации большинства элементов обнаружены в ветвях макрофитов возрастом 2–3 мес.

5. Для целей биомониторинга загрязнения окружающей среды макро- и микроэлементами, включая тяжёлые металлы, предпочтительнее использовать молодые ветви цистозир возрастом 2–3 мес., чем другие морфоструктурные элементы макрофита.

6. Максимальные концентрации липидов и фукоксантина обнаружены в ветвях *C. barbata* возрастом 3–5 мес. в весенне-летний период. В водоросли отмечены высокие концентрации C14:0, C16:0, C18:0, C18:1(n-9), C18:2(n-6), C18:4(n-3), C20:4(n-6), C20:5(n-3) с максимумом в ветвях старше 3-х месяцев. Доля наиболее

ценных n-3 жирных кислот составляла в среднем 15,3 % от общего количества МЭЖК. Показано, что *C. barbata* имеет оптимальное для здоровья человека соотношение n-3/n-6 ПНЖК, равное 1,0.

7. Разработана новая технология получения лечебно-профилактического продукта из бурых водорослей рода *Cystoseira*, содержащего до 5% фукоксантина. Для этих целей можно использовать как свежесобранные макрофиты, так и водоросли из штормовых выбросов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев Д.Ф. Макрофитобентос российского Азово–Черноморья / Д.Ф. Афанасьев, И.Г. Корпакова. – Ростов н/Д : ФГУП АзНИИРХ, 2008. – 291 с.
2. Афанасьев Д.Ф. Макрофитобентос российского сектора Черного моря / Д.Ф. Афанасьев // Экол. моря. – 2005. – Вып. 68. – С. 19–25.
3. Афанасьев Д.Ф. Размерно–возрастная структура популяции цистозиры Северо–Кавказского побережья Черного и Азовского морей / Д.Ф. Афанасьев, О.В. Степаньян // Среда, биота и моделирование экологических процессов в Азовском море. – Апатиты: изд-во КНЦ РАН, 2001. – С. 125–135.
4. Беляева О.И. Уровни загрязнения ливневого стока, поступающего в бухты Севастополя (Черное море) / О.И. Беляева // Экология моря. – 2007. – Т. 73. – С. 21–23.
5. Бессонов Б.И. Фотоиндуцированные изменения в обмене $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$, $^{22}\text{Na}^+$, $^{32}\text{PO}_4^{3-}$, $^{35}\text{SO}_4^{3-}$, $^{45}\text{Ca}^{2+}$, $^{59}\text{Fe}^{3+}$ и $^{131}\text{J}^-$ между морской водой и талломами водорослей / Б.И. Бессонов, Н.Н. Бельчева, Г.Н. Саенко // Взаимодействие между водой и живым веществом. – 1979. – Т.1. – С. 103.
6. Блатов А.С. Гидрология и гидродинамика шельфовой зоны Чёрного моря (на примере южного берега Крыма) / А.С. Блатов, В.А. Иванов. – К. : Наук. думка, 1992. – 244 с.
7. Блинова Е.И. Водоросли– макрофиты и травы морей европейской части России (флора, распространение, биология, запасы, марикультура) / Е.И. Блинова. – М. : ВНИРО, 2007. – 114 с.
8. Бурдин К.С. Изучение возможностей использования макроводоросли *Cystoseira crinita* в качестве организма – монитора загрязнения Черного моря тяжелыми металлами / К.С. Бурдин, М.В. Гусев, М.В. Крупина, И.Б. Савелев // Вестник МГУ. Серия 16. Биология. – 1980. – № 3. – С. 3–10.
9. Бурдин К.С. Тяжёлые металлы в водных растениях (аккумуляция и токсичность) / К.С. Бурдин, Е.Ю. Золотухина. – М. : Диалог МГУ, 1998. – 202 с.

10. Бурдин К.С. Физиологические механизмы регулирования содержания тяжёлых металлов в морских макроводорослях / К.С. Бурдин, М.В. Крупина, И.Б. Савельев // Вестник МГУ. Серия 16. Биология. – 1990. – №2. – С. 35–42.
11. Гидрометеорология и гидрохимия морей. Том 04. Черное море. Выпуск 1. Гидрометеорологические условия. Справочник // СПб : Гидрометеиздат, 1991. – 430 с.
12. ГОСТ 26929-86. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения токсичных элементов. – Москва : Стандартинформ, 2010. – 12 с.
13. Гуреева Е.В. Содержание фукоксантина, меди и цинка в бурых водорослях Черного моря / Е.В. Гуреева // Вода: Химия и экология. – 2017. - №11-12. – С. 36-41.
14. Дейнека В.И. Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения / В.И. Дейнека, А.А. Шапошников, Л.А. Дейнека, Т.С. Гусева, С.М. Вострикова, Е.А. Шенцева, Л.Р. Закирова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия : Медицина. Фармация. – 2008. – Т. 6, № 6 (46).– С. 19–25.
15. Золотухина Е.Ю. Бурая водоросль *Cystoseira crinita* (Desf.) Vody как монитор тяжелых металлов в прибрежных экосистемах Черного моря / Е.Ю. Золотухина, Н.В. Родзинская // Вестник МГУ. Сер 16, Биология. – 1993. – Вып. 4. – С. 52-57.
16. Иванов В.Н. Гидрохимический режим вод Севастопольского взморья и его перспективы для хозяйственного использования / В.Н. Иванов, А.А. Субботин, В.И. Губанов, Е.А. Куфтаркова, М.С. Немировский, А.В. Пархоменко // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон и комплексное использование ресурсов шельфа. – 2003. – Вып. 7. – С. 134-143.
- 16.. Иваненко Н.Б. Определение химических форм микроэлементов в биологических объектах / Н.Б. Иваненко, Н.Д. Соловьева, А.А. Иваненко, Л.Н. Москвин // Аналитика и контроль. - 2012. - № 2. - С. 108–133.

17. Кавецкий В.Н. Содержание тяжёлых металлов в воде и некоторых водных растениях устьевых областей Дуная и Днестра / В.Н. Кавецкий, А.И. Карнаухов, И.М. Пашенко // Гидробиол. журн. – 1984. – Вып. 20, № 2. – С. 65-68.
18. Калугина–Гутник А.А. Фитобентос Черного моря / А.А. Калугина-Гутник. – Киев: Наукова думка, 1975. – 246 с.
19. Камнев А.Н. Структура и функции бурых водорослей / А.Н. Камнев. - М.: МГУ, 1989. - 200 с.
20. Капков В.И. Водоросли как биомаркеры загрязнения тяжёлыми металлами морских прибрежных экосистем : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.00.18 / Капков Валентин Иванович. – Москва, 2003. – 48 с.
21. Карты побережья Черного моря [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://blacksea-map.ru/map_black_sea_current_map576665_0_0.htm. – (Дата обращения: 11.09.2017).
- 21.. Кейтс М. Техника липидологии: Выделение, анализ и идентификация липидов / Кейтс М. Пер. с англ. д-ра хим. наук В. А. Вавера. - Москва : Мир, 1975. – 322 с.
22. Ковардаков С.А. Комплексная адаптация цистозиры к градиентным условиям / С.А. Ковардаков, А.В. Празукин, Ю.К. Фирсов, А.Е. Попов. – Киев : Наук. думка, 1985. – 216 с.
23. Крупина М.В. Временные аспекты загрязнения среды тяжелыми металлами на примере водной растительности / М.В. Крупина // Вопросы современной альгологии. – 2012. – Т. 2, № 2. – С. 130.
24. Куфтаркова Е.А. Гидрохимическая характеристика отдельных бухт Севастопольского взморья / Е.А. Куфтаркова, Н.Ю. Родионова, В.И. Губанов, Н.И. Бобко // Труды ЮГНИРО. – 2008. – Т. 46. – С. 110-117.
25. Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / В.Г. Ладыгин // Вопросы современной альгологии. – 2015. – 87 с.

26. Ладыгин В.Г. Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот / В.Г. Ладыгин, Г.Н. Ширшикова // Журнал общей биологии. - 2006. - Т. 67, №3. - С. 163-189.
27. Лазоренко Г.Е. Влияние бытовых сточных вод на распределение ряда металлов в черноморской бурой водоросли *Cystoseira crinita* (Desf.) Bory / Г.Е. Лазоренко, А.В. Празукин, К.М. Хайлов // Экология. – 1985. – Вып. 2. – С. 82-85.
28. Макаров М.В. Адаптация водорослей Баренцева моря к условиям освещения : автореф. дисс. ... докт. биол. наук : 25.00.28 / Михаил Владимирович Макаров. – Мурманск, 2010. – 51 с.
29. Макаров М.В. Влияние освещения и температуры на макроводоросли Баренцева моря / М.В. Макаров, Г.М. Воскобойников // Вопросы современной альгологии. - 2017. - №3(15). URL: <http://algology.ru/1183>.
30. Мур Дж. Тяжелые металлы в природных водах: Контроль и оценка влияния / Дж. Мур, С. Рамамурти. – М. : Мир, 1987. – 286 с.
31. Мурадов С.В. Воздействие тяжелых металлов на водоросли-макрофиты Авачинской губы / С.В. Мурадов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 9-9. – С. 1998-2002.
32. Облучинская Е.Д. Технологии лекарственных и лечебно-профилактических средств из бурых водорослей / Е.Д. Облучинская. Апатиты: Изд. Кольского научного центра РАН, 2005. – 164 с.
33. Омельченко С.О. Сравнительная характеристика микробного и химического загрязнения бычка-кругляка, обитающего в Черном и Азовском морях и Керченском проливе / С.О. Омельченко, Т.Б. Ковыршина // Водні біоресурси та їх відтворення. – 2013. – №2. – С. 3-9.
34. Панькова Е.С. Особенности распределения тяжелых металлов в бурой водоросли цистозира барбата *Cystoseira barbata* (Анапский район Краснодарского края) / Е.С. Панькова, А.Н. Камнев, Е.И. Голубева // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ). – 2015. – Вып. 5, № 14. – С. 25-28.
35. Парчевский В.П. Анализ морфологических признаков черноморских цистозир в онтогенетическом ряду в природных условиях / В.П. Парчевский, Г.В.

Парчук // III всесоюзн. совещ. по морской альгологии и макро-фитобентосу, 1979 г. : тез. докл. – Киев : Наукова думка, 1979. – С. 96-98.

36. Пат. RU2399298C1 Российская Федерация. МПК A23L1/00 Способ переработки бурых водорослей / Герасименко Н.И. (RU), Бусарова Н.Г. (RU), Козловская Э.П. (RU); заявитель и патентообладатель Тихоокеанский институт биоорганической химии дальневосточного отделения Российской Академии Наук (ТИБОХ ДВО РАН) -№2009119267/13; заявл. 21.05.2009, опубл. 20.09.2010.

37. Пат. 86671U UA, МПК C12P 23/00. Спосіб одержання лікувально-профілактичного продукту з фукоксантином / В. М. Єремєєв, В. І. Рябушко, О. В. Попова, Л. І. Мусатенко, Л. В. Войтенко, Н. В. Поспелова, М. В. Нехорошев; заявители и патентообладатели Інститут біології південних морів ім. О. О. Ковалевського НАН України (UA), Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України (UA). – u 201307660; заявл. 17.06.2013; опубл. 01.2014, Бюл. № 1.

38. Пат. 2658705 Российская Федерация. МПК A23L 17/60 Способ получения профилактического продукта из черноморских водорослей рода *Cystoseira* (варианты) / Нехорошев М.В., (RU), Рябушко В.И. (RU), Гуреева Е.В. (RU); заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт морских биологических исследований имени А.О. Ковалевского РАН» -№ 2016140006; заявл. 11.10.2016, опубл. 22.06.2018 Бюл. № 18.

39. Патин С.А. Влияние загрязнения на биологические ресурсы и продуктивность Мирового океана / С.А. Патин. М.: Пищепромиздат, 1979. – 325 с.

40. Патин С.А. Поглощение и накопление ^{54}Mn и ^{65}Zn хлореллой / С.А. Патин, В.Н. Ткаченко, Л.В. Федотова // Труды ВНИРО. Экологические аспекты химического и радиоактивного загрязнения водной среды. – 1974. – С. 58–62.

41. Пашкевич М.А. Использование макрофитов для эколого-геохимического мониторинга состояния Цемесской (Новороссийской) бухты / М.А. Пашкевич, А.В. Алексеенко // ВОДА: ХИМИЯ и ЭКОЛОГИЯ. – 2016. - № 2. – С. 18-23.

42. Погребняк И.И. Развитие цистозеры в северо– западной части Черного моря / И.И. Погребняк, Т.И. Еременко, П.П.Островчук // III съезд всесоюзн. гид–робиол. общ–ва, 1976 : тез.докл. – Рига, 1976. – Т. 1. – С. 165.
43. Подкорытова А.В. Химический состав бурых водорослей Черного моря: род *Cystoseira*, перспектива их использования / А.В. Подкорытова, Л.Х. Вафина // Технология переработки водных биоресурсов. – 2013. – Вып. 150. – С. 100-107.
44. Полищук Р.А. О механизме альгицидного действия некоторых тяжёлых металлов / Р.А. Полищук // Биология моря. – 1975. – Вып. 35. – С. 52.
45. Празукин А.В. Феноменологическое описание роста ветвей *Cystoseira barbata* как основа периодизации их онтогенеза / А.В. Празукин // Экология моря. – 1983. – Вып. 15. – С. 49-58.
46. Празукин А.В. Морфофункциональные образы растения (на примере многоклеточных водорослей) / А.В. Празукин // Вестник Тверского гос. ун–та, серия «Биология и экология». – 2008. – Вып. 85, №3. – С. 206-218.
47. Промысловые биоресурсы Черного и Азовского морей / Ред. В.Н. Еремеев, А.В. Гаевская, Г.Е. Шульман, Ю.А. Загородняя. – Севастополь : ЭКОСИ–Гидрофизика, 2011. – 367 с.
48. Рябушко Л.И. Микрофитобентос Черного моря / Л.И. Рябушко. Севастополь : Экокси–Гидрофизика, 2013. – 416 с.
49. Современное состояние биоразнообразия прибрежных вод Крыма (черноморский сектор) / Ред. В.Н. Еремеев, А.В. Гаевская. – Севастополь : ЭКОСИ–Гидрофизика, 2003. – 511 с.
50. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011). Утвержден решением Комиссии Таможенного союза от 9 дек. 2011 г. № 880.
51. Теюбова В.Ф. Особенности накопления тяжелых металлов в разновозрастных талломах цистозеры (новороссийская бухта, Черное море) / В.Ф. Теюбова // Морський екологічний журнал. – 2011. - № 3. – С. 67-75.
52. Теюбова В.Ф. Разнообразие и экологические особенности макрофитобентоса Российского сектора Черного моря : автореф. дис. ... канд. биол.

наук : 03.02.08 - экология / Теюбова Виктория Федоровна. – Краснодар, 2012. – 23 с.

53. Титлянов Э.А. Адаптация водорослей и кораллов к свету : автореф. дис. ... докт. биол. наук : 03.00.10 / Титлянов Эдуард Антонинович. – Владивосток, 1983. – 60 с.

54. Титлянов Э.А. Новый тип адаптации водных растений к свету / Э.А. Титлянов, П.В. Колмаков, В.А. Лелеткин, Г.М. Воскобойников // Биология моря. – 1987. - № 2. - С. 48-57.

55. Тоичкин А. Биоиндикаторная роль бурой водоросли *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Ag. в мониторинге загрязнения прибрежных акваторий Чёрного моря тяжёлыми металлами / А. Тоичкин // Понт Эвксинский V : Междун. науч.-практич. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем, 24–27 сентября 2007 г. : тез. докл. – Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. – С. 148.

56. Фирсов Ю.К. Связь физиологических функций морфологических элементов слоевища цистозеры с их возрастом и структурой / Ю.К. Фирсов // Биология моря. – 1978. – Вып. 44. – С. 68–73.

57. Хайлов К.М. Иерархическая регуляция структуры и функции морских растений / К.М. Хайлов, В.П. Парчевский. Киев : Наукова думка, 1983. – 254 с.

58. Христофорова Н.К. Содержание микроэлементов Fe, Mn, Ni, Cr, Cu, Zn в белках морских водорослей / Н.К. Христофорова, Н.А. Синьков, Г.Н. Саенко, М.Д. Корякова // Биология моря. – 1976. – №2. – С. 69-72.

59. Яценко Г.К. Физиологические особенности черноморской бурой водоросли цистозеры *Cystoseira barbata* (Good et Wood) Ag. : автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Г.К. Яценко. – Одесса, 1963. – 18 с.

60. Abidov M. The effect of Xanthigen in the weight management of obese premenopausal women with non-alcoholic fatty liver disease and normal liver fat / M. Abidov, Z. Ramazanov, R. Seifulla, S. Grachev // Diabetes Obes. Metab. – 2010. – Vol. 12. – P. 72–81.

61. Airanthi M.W.A. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds / M.W.A. Airanthi, M. Hosokawa, K.J. Miyashita // J. Food Sci. – 2011. – Vol. 76. – P. 104–C111.
62. Airanthi M.K. Effect of brown seaweed lipids on fatty acid composition and lipid hydroperoxide levels of mouse liver / M.K. Airanthi, N. Sasaki, S. Iwasaki, N. Baba, M. Abe, M. Hosokawa, K. Miyashita // Journal of agricultural and food chemistry. – 2011. – Vol. 59, iss. 8. – P. 4156-4163.
63. Akcali I. A biomonitoring study: heavy metals in macroalgae from eastern Aegean coastal areas / I. Akcali, F. Kucuksezgin // Marine pollution bulletin. – 2011. – Vol. 62, iss. 3. – P. 637-645.
64. Akimoto S. Excitation relaxation dynamics and energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll a/c-protein complexes, probed by time-resolved fluorescence / S. Akimoto, A. Teshigahara, M. Yokono, M. Mimuro, R. Nagao, T. Tomo // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. – 2014. – Vol. 1837, iss. 9. – P. 1514-1521.
65. Aksu Z. Investigation of simultaneous biosorption of copper (II) and chromium (VI) on dried *Chlorella vulgaris* from binary metal mixtures: application of multicomponent adsorption isotherms / Z. Aksu, Ü. Açıkel, T. Kutsal // Separation science and technology. – 1999. – Vol. 34, iss. 3. – P. 501–524.
66. Aldini G. Biomarkers for antioxidant defense and oxidative damage / G. Aldini, K.-J. Yeum, E. Niki, R.M. Russell. – John Wiley & Sons, 2011. – 363 p.
67. Al-Masri M. Radionuclides and trace metals in eastern Mediterranean Sea algae / M. Al-Masri, S. Mamish, Y. Budier // Journal of Environmental Radioactivity. – 2003. – Vol. 67, iss. 2. – P. 157-168.
68. Alscher R.G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants / R.G. Alscher, N. Erturk, L.S. Heath // Journal of experimental botany. – 2002. – Vol. 53, iss. 372. – P. 1331-1341.
69. Aly W. Metal contamination in water, sediment and biota from a semi-enclosed coastal area / W. Aly, I.D. Williams, M.D. Hudson // Environ Monit Assess. – 2013. – Vol. 185, iss. 5. – P. 3879-3895.

70. Andrade L.R. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity / L.R. Andrade, R.N. Leal, M. Nosedá, M. E.R. Duarte, M.S. Pereira, P.A. Mourão, M. Farina, G.M. Amado Filho // *Marine Pollution Bulletin*. - 2010. – Vol. 60, iss. 9. – P. 1482-1488.

71. Armbrust E.V. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism / E.V. Armbrust, J.A. Berges, C. Bowler, B.R. Green, D. Martinez, N.H. Putnam, S. Zhou // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – P. 79–86.

72. Asai A. Biotransformation of fucoxanthinol into amarouciaxanthin A in mice and HepG2 cells: Formation and cytotoxicity of fucoxanthin metabolites / A. Asai, T. Sugawara, H. Ono, A. Nagao // *Drug Metab. Dispos.* – 2004. – Vol. 32. – P. 205–211.

73. Aydın-Önen S. Investigation of heavy metal pollution in eastern Aegean Sea coastal waters by using *Cystoseira barbata*, *Patella caerulea*, and *Liza aurata* as biological indicators / S. Aydın-Önen, M. Öztürk // *Environ. Sci. Pollut. Res.* – 2017. – Vol. 24, iss. 8. – P. 7310-7334.

74. Balboa E.M. In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae / E.M. Balboa, E. Conde, A. Moure, E. Falqué, H. Domínguez // *Food chemistry*. – 2013. – Vol. 138, iss. 2. – P. 1764-1785.

75. Bartley G. Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health / G. Bartley, P.A. Scolinik // *Plant Cell*. – 1995. – Vol. 7. – P. 1027–1038.

76. Baumann H.A. Metal accumulation and toxicity measured by PAM—chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae / H.A. Baumann, L. Morrison, D.B. Stengel // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2009. – Vol. 72, iss. 4. – P. 1063-1075.

77. Bayramoğlu G. Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu (II), Zn (II) and Ni (II): kinetics and equilibrium studies / G. Bayramoğlu, M.Y. Arica // *Bioresource Technology*. – 2009. – Vol. 100, iss. 1. – P. 186–193.

78. Ben-Hur A. Support vector clustering / A. Ben-Hur, D. Horn, H. Siegelmann, V. Vapnik // *J. Mach. Learn. Res.* – 2001. – Vol. 2. – P. 125–137.

79. Berkaloff C. Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigment analysis / C. Berkaloff, L. Caron, B. Rousseau // *Photosynthesis Research*. – 1990. – Vol. 23, iss. 2. – P. 181–193.
80. Bertagnolli C. Chromium biosorption using the residue of alginate extraction from *Sargassum filipendula* / C. Bertagnolli, M.G.C. da Silva, E. Guibal // *Chemical Engineering Journal*. – 2014. – Vol. 237. – P. 362–371.
81. Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms / M. Bertrand // *Photosynth. Res.* – 2010. – Vol. 106. – P. 89–102.
82. Bilal M. Biosorption: An Interplay between Marine Algae and Potentially Toxic Elements - A Review / M. Bilal, T. Rasheed, J. Sosa-Hernández, A. Raza, F. Nabeel, M.N. Hafiz // *Mar. Drugs*. – 2018. – Vol. 16, iss. 2. – P. 65.
83. Blunt J.W. Marine natural products / J.W. Blunt, B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Munro, P.T. Northcote, M.R. Prinsep // *Nat. Prod. Rep.* – 2009. – Vol. 26. – P. 170–244.
84. Bonin P. Molecular and biochemical characterization of mannitol-1-phosphate dehydrogenase from the model brown alga *Ectocarpus* sp / P. Bonin // *Phytochemistry*. – 2015. – Vol. 117. – P. 509–520.
85. Bonnett R. Carotenoids and related compounds. Part XX. Structure and reactions of fucoxanthin / R. Bonnett, A.K. Mallams, A.A. Spark, J.L. Tee, B.C.L. Weedon // *J. Chem. Soc.* – 1969. – Vol. 3. – P. 429–454.
86. Bonnett R. Fucoxanthin / R. Bonnett, A.A. Spark, J. Tee, B.C.L. Weedon // *Proc. Chem. Soc.* – 1964. – P. 419.
87. Borowitzka M.A. Vitamins and fine chemicals from microalgae / M.A. Borowitzka // *Microalgal Biotechnolog.* – 1988. – P. 153–196.
88. Bridges C.C. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals Toxicol / C.C. Bridges, R.K. Zalups // *Appl. Pharmacol.* – 2005. – Vol. 204, iss. 3. – P. 274–308.
89. Bryan G.W. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review / G.W. Bryan, W.J. Langston // *Environ. Pollut.* – 1992. – Vol. 76. – P. 89–131.

90. Bulteau A.L. Update on selenoprotein biosynthesis / A.L. Bulteau, L. Chavatte // *Antioxid. Redox. Signal.* - 2015. - Vol. 23. - P. 775–794.
91. Burdin K.S. Heavy metal accumulation by carrageenan and agar producing algae / K.S. Burdin, K.T. Bird // *Botanica Marina.* – 1994. – Vol. 37. – P. 467.
92. Butler A. Mechanistic considerations of halogenating enzymes / A. Butler, M. Sandy // *Nature.* – 2009. – Vol. 460. – P. 848–854.
93. Calder P.C. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids / P.C. Calder // *J. Nutr.* – 2012. – Vol. 142. – P. 592S–599S.
94. Caliceti M. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon / M. Caliceti, E. Argese, A. Sfriso, B. Pavoni // *Chemosphere.* – 2002. – Vol. 47, iss. 4. – P. 443-454.
95. Campbell S.A. Seasonal cycles in the carotenoid content in *Mytilus edulis* / S.A. Campbell // *Marine Biology.* – 1969. – Vol. 4. – P. 227-232.
96. Campbell S.J. Seasonal patterns in the photosynthetic capacity, tissue pigment and nutrient content of different developmental stages of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta : Laminariales) in Port Phillip Bay south-eastern Australia / S.J. Campbell, J.S. Bite, T.R. Burridge // *Botanica Marina.* – 1999. – Vol. 42, iss. 3. – P. 231-241.
97. Cannon B. Brown adipose tissue: Function and physiological significance / B. Cannon, J. Nedergaard // *Physiol. Rev.* – 2004. – Vol. 84. – P. 277–359.
98. Chan C.X. *Porphyra* (Bangiophyceae) transcriptomes insights into red algal development and metabolism / C.X. Chan, N.A. Blouin, Y. Zhuang, S. Zauner, S.E. Prochnik, E. Lindquist, S. Lin, C. Benning, M. Lohr, C. Yarish // *J. Phycol.* – 2012. – Vol. 48. – P. 1328–1342.
99. Chaudhuri A. Heavy metal biomonitoring by seaweeds on the Delmarva Peninsula, east coast of the USA / A. Chaudhuri, M. Mitra, C. Havrilla, Y. Waguespack, J. Schwarz // *Botanica Marina.* – 2007. – Vol. 50. – P. 151–158.
100. Chesalin M.V. Fucoxanthin content and chemical composition in brown alga *Nizamuddinina zanardinii* (Phaeophyta) collected from Mirbat, Southern Oman (the Arabian Sea) / M.V. Chesalin, S. Al-Ghassani, V.I. Ryabushko, N.I. Bobko, E.V.

Gureeva, M.V. Nekhoroshev // International Journal on Algae. – 2017. – Vol. 19, № 3. – P. 259–270.

101. Chojnacka K. Biosorption and bioaccumulation—the prospects for practical applications / K. Chojnacka // Environment international. – 2010. – Vol. 36, iss. 3. – P. 299–307.

102. Chuyen V. Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health / V. Chuyen, J. Eun // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2015. – Vol. 57, iss. 12. – P. 2600–2610.

103. Cock J.M. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae / J.M. Cock, L. Sterck, P. Rouze, D. Scornet, A.E. Allen, G. Amoutzias, V. Anthouard // Nature. – 2010. – Vol. 465. – P. 617–621.

104. Coesel S. Evolutionary origins and functions of the carotenoid biosynthetic pathway in marine diatoms / S. Coesel, M. Obornik, J. Varela, A. Falciatore, C. Bowler // PloS ONE. – 2008. – Vol. 3, iss. 8. – P. e2896.

105. Collobert R. Links between Perceptrons, MLPs and SVMs / R. Collobert, S. Bengio // Proc. Int'l Conf. Machine Learning (ICML '04). – 2004.

106. Conti M.E. Baseline trace metals in seagrass, algae, and mollusks in a southern Tyrrhenian ecosystem (Linosa Island, Sicily) / M.E. Conti, B. Bocca, M. Iacobucci, M. G. Finoia, M. Mecozzi, A. Pino, A. Alimonti // Archives of environmental contamination and toxicology. – 2010. – Vol. 58, iss. 1. – P. 79–95.

107. Coupe E.E. The dodecameric vanadium-dependent haloperoxidase from the marine algae *Corallina officinalis*: Cloning, expression, and refolding of the recombinant enzyme / E.E. Coupe, M.G. Smyth, A.P. Fosberry // Protein Expression & Purification. – 2007. – Vol. 52, iss. 2. – P. 265–272.

108. Costa G.B. The brown seaweed *Sargassum cymosum*: changes in metabolism and cellular organization after long-term exposure to cadmium / G.B. Costa, C. Simioni, D. T. Pereira, F. Ramlov, M. Maraschin, F. Chow, P.A. Horta, Z.L. Bouzon, É.C. Schmidt // Protoplasma. – 2017. – Vol. 254, iss. 2. – P. 817–837.

109. Cox E.H. Zinc-dependent protein folding / E.H. Cox, G.L. McLendon // Current opinion in chemical biology. – 2000. – Vol. 4. – P. 162–165.

110. Dambek M. Biosynthesis offucoxanthin and diadinoxanthin and function of initial pathway genes in *Phaeodactylum tricornutum* / M. Dambek, U. Eilers, J. Breitenbach, S. Steiger, C. Buchel, G.J. Sandmann // Exp. Bot. – 2012. – Vol. 63. – P. 5607-5612.

111. Das S.K. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D / S.K. Das, T. Hashimoto, K. Kanazawa // Biochim. Biophys. Acta. – 2008. – Vol. 1780. – P. 743-749.

112. Dawczynski C. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products / C. Dawczynski, R. Schubert, G. Jahreis // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 103, iss. 3. – P. 891-899.

113. Dean P.R. Seasonal growth, erosion rates, and nitrogen and photosynthetic ecophysiology of *Undaria pinnatifida* (Heterokontophyta) in southern New Zealand / P.R. Dean, C.L. Hurd // Journal of Phycology. – 2007. – Vol. 43, iss. 6. – P. 1138-1148.

114. del Rio-Celestino M. Distribution of fatty acids in edible organs and seed fractions of borage (*Borago officinalis* L.) / M. del Rio-Celestino, R. Font, A. de Haro-Bailon // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2008. – Vol. 88, iss. 2. – P. 248-255.

115. Dembitsky V.M. Allenic and cumulenenic lipids / V.M. Dembitsky, T. Maoka // Prog. Lipid Res. – 2007. – Vol. 46. – P. 328-375.

116. Dembitsky V.M. Glycolipids, phospholipids and fatty acids of brown algal species / V.M. Dembitsky, O.A.Rozentsvet, E.E. Pechenkina // Phytochemistry. – 1990. – Vol. 29. – P. 3417-3423.

117. D'Orazio N. Fucoxanthin: a treasure from the sea / N. D'Orazio, E. Gemello, M. Gammone // Marine Drugs. – 2012. – Vol. 10. – P. 604–616.

118. dos Santos R.W. Effects of cadmium on growth, photosynthetic pigments, photosynthetic performance, biochemical parameters and structure of chloroplasts in the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) / dos Santos R.W., É.C. Schmidt, R.d.P. Martins, A. Latini, M. Maraschin, P.A. Horta, Z.L. Bouzon // American Journal of Plant Sciences. – 2012. – Vol. 3, iss. 8. – P. 1077.

119. Dou Y. Distribution, enrichment and source of heavy metals in surface sediments of the eastern Beibu Bay, South China Sea / Y. Dou, J. Li, J. Zhao, B. Hu, S. Yang // *Marine Pollut. Bull.* – 2013. – Vol. 67, iss. 1. – P. 137-145.

120. Dring M.J. Chromatic adaptation of photosynthesis in benthic marine algae: an examination of its ecological significance using a theoretical model / M.J. Dring // *Limnol. Oceanogr.* – 1981. – Vol. 26. – P. 271-282.

121. Dring M.J. Pigment composition and photosynthetic action spectra of sporophytes of *Laminaria* (Phaeophyta) grown in different light qualities and irradiances / M.J. Dring // *British Phycological Journal.* – 1986. – Vol. 21, iss. 2. – P. 199-207.

122. Duncan E. Contribution of arsenic species in unicellular algae to the cycling of arsenic in marine ecosystems / E. Duncan, W. Maher, S. Foster // *Environ. Sci. Technol.* – 2015. – Vol. 49, iss. 1. – P. 33-50.

123. Edmonds J.S. Organoarsenic compounds in the marine environment/ J.S. Edmonds, K.A. Francesconi / In *Organometallic Compounds in the Environment*, Craig P.J. – Ed. John Wiley and Sons: New York, 2003. – P. 196-222.

124. Eisler R. Compendium of trace metals and marine biota. Volum 1: Plants and Invertebrates / Eisler R.: Elsevier Science, 2010. 638 p.

125. El-Sheikh A.M. Sodium and rubidium as possible nutrients for sugar beet plants / A.M. El-Sheikh, A. Ulrich, T.C. Broyer // *Plant Physiol.* – 1967. – Vol. 42, iss. 9. – P. 1202-1208.

126. Eonseon J. Xanthophylls in microalgae: From biosynthesis to biotechnological mass production and application / J. Eonseon, J.E.W. Polle, H.K. Lee, S.M. Hyun, M. Chang // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 165-174.

127. Erkkila A. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: An epidemiological approach / A. Erkkila, V. de Mello, U. Risirus, D. Laaksonen // *Prog. Lipid Res.* – 2008. – Vol. 47, iss. 3. – P. 172-187.

128. Eugster C.H. Chemical derivatization: Microscale tests for the presence of common functional groups in carotenoids / C.H. Eugster, A.G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander // *Carotenoids*, Vol. 1A: Isolation and Analysis. – Basel, 1995. – P. 71-80.

129. Evans C.H. Interesting and useful biochemical properties of lanthanides / C.H. Evans // Trends Biochem. Sci. – 1983. – Vol. 8, iss. 12. – P. 445-449.
130. Fariman G.A. Seasonal variation of total lipid, fatty acids, fucoxanthin content, and antioxidant properties of two tropical brown algae (*Nizamuddinina zanardinii* and *Cystoseira indica*) from Iran / S.J. Shastan, M.M. Zahedi // Journal of Applied Phycology. – 2015. – Vol. 28, iss. 2. – P. 1323-1331.
131. Farkas E. The role of titanium in plant life III / E. Farkas, A. Richnovszky, I. Pais // Acta Agron. Hung. - 1981. – Vol. 30. – P. 371-376.
132. Farre G. Travel advice on the road to carotenoids in plants / G. Farre, G. Sanahuja, S. Naqvi, C. Bai, T. Capell, C. Zhu, P. Cristou // Plant Sci. – 2010. – Vol. 179. – P. 28-48.
133. Figueira P. Comparative study on metal biosorption by two macroalgae in saline waters: single and ternary systems / P. Figueira, B. Henriques, A. Teixeira, C.B. Lopes, A.T. Reis, R.J. Monteiro, A. Duarte, M. Pardal, E. Pereira // Environmental Science and Pollution Research. – 2016. – Vol. 23, iss. 12. – P. 11985-11997.
134. Frank H.A. Carotenoids in photosynthesis / H.A. Frank, R.J. Cogdell // Photochemistry and Photobiology. – 1996. – Vol. 63, iss. 3. – P. 257-264.
135. Freedman D.A. Statistical Models: Theory and Practice / D.A. Freedman - Berkeley: University of California, 2009. - 443 p.
136. Friedman J.M. Obesity in the new millennium / J.M. Friedman // Nature. – 2000. – Vol. 404. – P. 632-634.
137. Fu F.F. Distribution of rare earth elements in seaweed: implication of two different sources of rare earth elements and silicon in seaweed / F.F. Fu, T. Akagi, S. Yabuki, M. Iwaki, N. Ogura // J. Phycol. – 2000. – Vol. 36, iss. 1. – P. 62-70.
138. Fung A. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida* / A. Fung, N. Hamid, J. Lu // Food Chemistry. – 2013. – Vol. 136. – P. 1055-1062.
139. Gerasimenko N.I. Seasonal changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata* / N.I. Gerasimenko, N.G. Busarova, O.P. Moiseenko // Russian journal of plant physiology. – 2010. – Vol. 57, iss. 2. – P. 205-211.

140. Ginneken V. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas / V. Ginneken, J. Helsper, W. de Visser, H. van Keulen, W. Brandenburg // *Lipids in Health and Disease*. – 2011. – Vol. 10. – P. 104-111.
141. Graham L.E. *Algae* / L.E. Graham, L. Wilcox. – N.Y. : Prentice–Hall, 2000. – 640 p.
142. Gruszecki W.I. Carotenoids in lipid membranes / W.I. Gruszecki. – N.Y. : CRC Press, 2009. – P. 19-30.
143. Gubanov V. I. Complex assessments of the Sevastopol offshore water quality (the Black Sea) / V. I. Gubanov, L.V. Stelmakh, N. P. Klimenko // *Ekologiya morya*, 2002, iss. 62, pp. 76–80.
144. Guschina I.A. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae / I.A. Guschina, J.L. Harwood // *Progress in Lipid Research*. – 2006. – Vol. 45, iss. 2. – P. 160-186.
145. Guven K.C. Heavy metal accumulation in algae and sediments of the Black Sea coast of Turkey / K.C. Guven, E. Okuş, S. Topcuoğlu, N. Esen, R. Küçükcezzar, E. Seddigh, D. Kut // *Toxicol. Environ. Chem.* – 1998. – Vol. 67, iss. 3-4. – P. 435-440.
146. Hagan G.B. Heavy metal contamination and physicochemical assessment of the Densu River Basin in Ghana / G.B. Hagan, F.G. Ofosu, E.K. Hayford, E.K. Osae, K. Oduro–Afriyie // *Res. J. Environ. Earth Sci.* – 2011. – Vol. 3, iss. 4. – P. 385-392.
147. Hajeb P. Toxic elements in food: occurrence, binding, and reduction approaches / P. Hajeb, J.J. Sloth, S. Shakibazadeh, N.A. Mahyudin, L. Afsah–Hejri // *Compr. Rev. Food Sci. F. Saf.* – 2014. – Vol. 13, iss. 4. – P. 457-472.
148. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exp. Bot.* – 2002. – Vol. 53. – P. 1-11.
149. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life / B. Halliwell // *Plant physiology*. – 2006. – Vol. 141, iss. 2. – P. 312-322.
150. Hamazaki T. The Japan society for lipid nutrition recommends to reduce the intake of linoleic acid. A review and critique of the scientific evidence / T. Hamazaki, H. Okuyama // *World Rev. Nutr. Diet.* – 2003. – Vol. 92. – P. 109–32.

151. Hanic L.A. Studies on the algal cuticle / L.A. Hanic, J.S. Craigie // Journal of Phycology. – 1969. – Vol. 5, iss. 2. – P. 89-102.
152. Haug A.S. Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjord areas by analysis of the brown alga *Ascophyllum nodosum* / A.S. Haug, S. Melsom, S. Omang // Environmental Pollution. – 1974. – Vol. 7, iss. 3. – P. 179-192.
153. Haugan Y.A. Isolation of fucoxanthin and peridinin / Y.A. Haugan, T. Aakermann, S. Liaaen-Jensen // Methods in enzymology. – 1992. – Vol. 213. – P. 213-245.
154. Havaux M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts / M. Havaux // Trends in Plant Science. – 1998. – Vol. 3, iss. 4. – P. 147-151.
155. He J. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools / J. He, J.P. Chen // Bioresource technology. – 2014. – Vol. 160. – P. 67-78.
156. Henriques B. Bioaccumulation of Hg, Cd and Pb by *Fucus vesiculosus* in single and multi-metal contamination scenarios and its effect on growth rate / B. Henriques, C. B. Lopes, P. Figueira, L.S. Rocha, A.C. Duarte, C. Vale, M.A. Pardal, E. Pereira // Chemosphere. – 2017. – Vol. 171. – P. 208-222.
157. Heo S.J. Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages / S.J. Heo, W.J. Yoon, K.N. Kim, G.N. Ahn, S.M. Kang, D.H. Kang // Food Chem. Toxicol. – 2010. – Vol. 48. – P. 2045-2051.
158. Heo S.J. Protective effect of fucoxanthin isolated from *Sargassum siliquastrum* on UV-B induced cell damage / S.J. Heo, Y.J. Jeon // J. Photochem. Photobiol. – 2009. – Vol. 95. – P. 101-107.
159. Ho Y. Metal levels in three intertidal macroalgae in Hong Kong waters / Y. Ho // Aquatic botany. – 1988. – Vol. 29, iss. 4. – P. 367-372.
160. Holan Z. Biosorption of cadmium by biomass of marine algae / Z. Holan, B. Volesky, I. Prasetyo // Biotechnology and bioengineering. – 1993. – Vol. 41, iss. 8. – P. 819-825.
161. Holan Z. Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae / Z. Holan, B. Volesky // Biotechnol. Bioengineer. – 1994. – Vol. 43, iss. 11. – P. 1001-1009.

162. Holdt S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation / S. Holdt, S. Kraan // J. Appl. Phycol. – 2011. – P. 1-55.
163. Hoppe H.A. Marine algae in pharmaceutical science / H.A. Hoppe, Levring T., Y. Tanaka. Berlin; New York, 1979. – 351 p.
164. Hosokawa M. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPARgamma ligand, troglitazone, on colon cancer cells / M. Hosokawa, M. Kudo, H. Maeda, H. Kohno, T. Tanaka, K. Miyashita // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – Vol. 1675. – P. 113-119.
165. Hosokawa M. Fucoxanthin regulates adipocytokine mRNA expression in white adipose tissue of diabetic/obese KK–Ay mice / M. Hosokawa, T. Miyashita, S. Nishikawa, S. Emi, T. Tsukui, F. Beppu, T. Okada, K. Miyashita // Arch. Biochem. Biophys. – 2010. – Vol. 504. – P. 17-25.
166. Hou X. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae / X. Hou, X. Yan // Sci Total Environ. – 1998. – Vol. 222, iss. 3. – P. 141-156.
167. Huang J.J. Occurrence and biosynthesis of carotenoids in phytoplankton / J.J. Huang, S. Lin, W. Xu // Biotechnol. Adv. – 2017. – Vol. 35, iss. 5. – P. 597-618.
168. Hummel D.O. Infrared analysis of polymers, resins and additives: An Atlas. V. 1 / D.O. Hummel, F. Scholl. – Munich : Carl Hanser, 1971. – 225 p.
169. Ivanova V. Fatty acid composition of Black sea *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita* / V. Ivanova, M. Stancheva, D. Petrova // Bulg. J. Agric. Sci. – 2013. – Vol. 19, iss. S1. – P. 42-47.
170. Iwamoto K. Salt-regulated mannitol metabolism in algae / K. Iwamoto, Y. Shiraiwa // Marine Biotechnology. – 2005. – Vol. 7, iss. 5. – P. 407-415.
171. Jara C. Oxidative stress in the mollusk *Echinolittorina peruviana* (Gasteropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822) and trace metals in coastal sectors with mining activity / C. Jara, H. Gaete, G. Lobos, M. Hidalgo // Ecotoxicol. – 2014. – Vol. 23, iss. 6. – P. 1099-1108.

172. Jin Q. The evaluation and utilization of marine-derived bioactive compounds with anti-obesity effect / Q. Jin, H. Yu, P. Li // *Curr. Med. Chem.* – 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28571534>

173. Jothinayagi N. Heavy metal monitoring of Rameswaram Coast by some *Sargassum* species / N. Jothinayagi, C. Anbazhagan // *American – Eurasean J. of Sci. Res.* – 2009. – Vol. 4, iss. 2. – P. 73-80.

174. Kanazawa K. Commercial-scale preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica* / K. Kanazawa, Y. Ozak, T. Hashimoto, S. Das, S. Matsushita, M. Hirano, T. Okada, A. Komoto, N. Mori, M. Nakatsuka // *Food Sci. Technol. Res.* – 2008. – Vol. 14. – P. 573-582.

175. Kannan K. Oxidative stress and apoptosis / K. Kannan, S.K. Jain // *Pathophysiol.* – 2000. – Vol. 7, iss. 3. – P. 153-163.

176. Karri V. Comparative in vitro toxicity evaluation of heavy metals (lead, cadmium, arsenic, and methylmercury) on HT-22 hippocampal cell line / V. Karri, V. Kumar, D. Ramos, E. Oliveira, M. Schuhmacher // *Biol. Trace Elem. Res.* - 2018. - Vol. 184, iss. 1. – P. 226-239.

177. Katoh T. Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dictyota dichotoma*. A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes / T. Katoh, M. Mimuro, S. Takaichi // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1989. - Vol. 976. - P. 233-240.

178. Katoh T. Xanthosomes: Supramolecular assemblies of xanthophyll-chlorophyll a/c protein complexes / Katoh T., Tanaka A., Mimuro M. // *Methods Enzymology.* – 1993. - Vol. 214. - P. 402-412.

179. Khaled A. Distribution of heavy metals in seaweeds collected along Marsa-Matrouh beaches, Egyptian Mediterranean Sea / A. Khaled, A. Hessein, A.M. Abdel-Halim, F.M. Morsy // *The Egyptian Journal of Aquatic Research.* – 2014. – Vol. 40, iss. 4. – P. 363-371.

180. Khoroshyy P. Quenching of chlorophyll triplet states by carotenoids in algal light-harvesting complexes related to fucoxanthin-chlorophyll protein / P. Khoroshyy, D.

Bína, Z. Gardian, R. Litvín, J. Alster, J. Pšenčík // *Photosynthesis Research*. – 2017. – P. 1-13.

181. Khotimchenko S.V. Fatty acids of marine algae from the Pacific coast of North California / S.V. Khotimchenko, V.E. Vaskovsky, T.V. Titlyanova // *Botanica Marina*. - 2002. – Vol. 45. – P. 17-22.

182. Khotimchenko S.V. Fatty acids of species in the genus *Codium* / S.V. Khotimchenko // *Botanica Marina*. – 2003. – Vol. 46, iss. 5. – P. 456-460.

183. Khotimchenko S.V. Lipids of different parts of the lamina of *Laminaria japonica* Aresch / S. V. Khotimchenko, I. V. Kulikova // *Botanica Marina*. – 2000. – Vol. 43, iss.1. – P. 87-91.

184. Kim J.M. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2–dimethylhydrazine initiation / J.M. Kim, S. Araki, D.J. Kim, C.B. Park, N. Takasuka, H. Baba–Toriyama, T. Ota // *Carcinogenesis*. – 1998. – Vol. 19. – P. 81-85.

185. Kim S.J. Characteristic and extraction of fucoxanthin pigment in *Undaria pinnatifida* / S.J. Kim, H.J. Kim, J.S. Moon, J.M. Kim, S.G. Kang, S.T. Jung // *J. Korean. Soc. F. Sci. Nutr.* – 2004. – Vol. 33. – P. 847-851.

186. Kim M.K. Seasonal variations of triacylglycerols and fatty acids in *Fucus serratus* / M.K. Kim, J.P. Dubacq, J.C.Thomas, G. Giraud // *Phytochemistry*. – 1996. – Vol. 43. – P. 49-55.

187. Kim S.M. A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography / S.M. Kim, Y.F. Shang, B.H. Um // *Phytochemical Analysis*. – 2011. – Vol. 22. – P. 322-329.

188. Kiss F. The Effect of Titanium and Gallium in Photosynthetic Rate of Algae / F. Kiss, G. Deak, M. Feher, A. Balogh, L. Szabolsci // *J. Plant Nutr.* – 1985. – Vol. 8. – P. 825-832.

189. Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation / A. Klug // *Annual review of biochemistry*. – 2010. – Vol. 79. – P. 213-231.

190. Konishi I. Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells / I. Konishi, M. Hosokawa, T. Sashima, H. Kobayashi, K. Miyashita // Comp. Biochem. Physiol. C. – 2006. – Vol. 142. – P. 53-59.
191. Kozhenkova S.I. Long-term monitoring of sea water pollution by heavy metals in northern primorye with the use of brown algae / S.I. Kozhenkova, N.K. Khristoforova, E.N. Chernova // Russian J. Ecol. – 2000. – Vol. 31, iss. 3. – P. 211-215.
192. Kravtsova A. Elemental accumulation in the Black Sea brown algae *Cystoseira* studied by neutron activation analysis / A. Kravtsova, N. Milchakova, M. Frontasyeva // Ecol. Chem. Eng. S. – 2014. – Vol. 21, iss. 1. – P. 9-23.
193. Kumari P. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs / P. Kumari, M. Kumar, V. Gupta, C.R.K. Reddy, B. Jha // Food Chemistry. – 2010. – Vol. 120, iss. 3. – P. 749-757.
194. Leusch A. Biosorption of heavy metals (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) by chemically-reinforced biomass of marine algae / A. Leusch, Z.R. Holan, B. Volesky // J. Chemical Technol. Biotechnol. – 1995. – Vol. 62, iss. 3. – P. 279-288.
195. Lewin J. Silicon and plant growth / J. Lewin, B.E.F. Reimann // Annual Review of Plant Physiology. – 1969. – Vol. 20, iss. 1. – P. 289-304.
196. Levy J. Lycopene is amore potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α -carotene or β -carotene / J. Levy, E. Bosin, B. Feldman, Y. Giat, A. Miinster, M. Danilenko, Y. Sharoni // Nutr. Cancer. – 1995. – Vol. 24. – P. 257-266.
197. Lim W.Y. Spatial variability ofmetals in surface water and sediment in the Langat river and geochemical factors that influence their water-sediment interactions / W.Y. Lim, A.Z. Aris, M.P. Zakaria // Sci. World J. – 2012. – P. 1-14.
198. Lin H.T.V. Effects of low-molecular-weight fucoidan and high stability fucoxanthin on glucose homeostasis, lipid metabolism, and liver function in a mouse model of type II diabetes / H.T.V. Lin // Marine drugs. – 2017. – Vol. 15, iss. 4. – P. 113.
199. Liu C.L. Fucoxanthin enhances HO-1 and NQO1 expression in murinehepatic BNL CL.2 cells through activation of the Nrf2/ARE system partially by its pro-

oxidantactivity / C.L. Ciu, Y.T. Chiu, M.L. Hu // J. Agric. Food Chem. – 2011. – Vol. 59. – P. 11344-11351.

200. Liu C.L. Inhibition of proliferation of a hepatoma cell line by fucoxanthin in relation to cell cycle arrest and enhanced gap junctional intercellular communication / C.L. Liu, Y.S. Huang, M. Hosokawa, K. Miyashita, M.L. Hu // Chem. Biol. Interact. – 2009. – Vol. 182. – P. 165-172.

201. Maeda H. Dietary combination of fucoxanthin and fish oil attenuates the weight gain of white adipose tissue and decreases blood glucose in obese/diabetic KK–Ay mice / H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, K.J. Miyashita // Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55. – P. 7701-7706.

202. Maeda H. Effect of medium–chain triacylglycerols on anti–obesity effect of fucoxanthin / H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama, K. Miyashita // Journal of Oleo Science. – 2007. – Vol. 56, iss. 12. – P. 615-621.

203. Maeda H. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues / H. Maeda, M. Hosokawa, T. Sashima, K. Funayama, K. Miyashita // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2005. – Vol. 332. – P. 392-397.

204. Malea P. Metal content in *Enteromorpha linza* (Linnaeus) in Thermaikos Gulf (Greece) / P. Malea, S. Haritonidis // Hydrobiologia. – 1999. – Vol. 394. – P. 103-112.

205. Manahan S.E. Environmental chemistry / S.E. Manahan. – Chelsea : Lewis Publishers, 1991. – 583 p.

206. Maret W. Coordination dynamics of zinc in proteins / W. Maret, Y. Li // Chem Rev. – 2009. – Vol. 109. – P. 4682-4707.

207. Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines / Y. Matsuzawa // FEBS Lett. – 2006. – Vol. 580. – P. 2917-2922.

208. McClure A. Oil Colour / A. McClure, J. Thomson, J. Tannahill // J. Chem. Assoc. – 1968. – Vol. 51. – P. 580.

209. McDevit D.C. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol / D.C. McDevit, G.W. Saunders // Phycological Res. – 2009. – Vol. 57, iss. 2. – P. 131-141.

210. Memon A. Taxonomic character of plant species in absorbing and accumulating alkali and alkaline earth metals grown in temperate forest of Japan / A. Memon, T. Kuboi, K. Fujii, S. Ito, M. Yatazawa // *Plant Soil*. – 1983. – Vol. 70. – P. 367-389.
211. Mei C.H. Antitumor effects of laminaria extract fucoxanthin on lung cancer / C.H. Mei // *Marine drugs*. – 2017. – Vol. 15, iss. 2. – P. 39.
212. Mein J.R. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention / J.R. Mein, F. Lian, X.D. Wang // *Nutr. Rev.* – 2008. – Vol. 66. – P. 667-683.
213. Merrifield M.E. Determination of the Cd/S cluster stoichiometry in *Fucus vesiculosus* metallothionein / M.E. Merrifield, J. Chaseley, P. Kille, M.J. Stillman // *Chemical research in toxicology*. – 2006. – Vol. 19, iss. 3. – P. 365-375.
214. Mikami K. Biosynthetic pathway and health benefits of fucoxanthin, an algae-specific xanthophyll in brown seaweeds / K. Mikami, M. Hosokawa // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, iss. 7. – P. 13763-13781.
215. Miyashita K. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds / K. Miyashita, S. Nishikawa, F. Beppu, A. Tsukui, M. Hosokawa // *J. Sci. Food Agric.* – 2011. – Vol. 91. – P. 1166-1174.
216. Mizoi J. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses / J. Mizoi, K. Shinozaki, K. Yamaguchi–Shinozaki // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2012. – Vol. 1819. – P. 86-96.
217. Mizuta H. Protective function of silicon deposition in *Saccharina japonica* sporophytes (Phaeophyceae) / H. Mizuta, H. Yasui // *Journal of applied phycology*. – 2012. – Vol. 24, iss. 5. – P. 1177-1182.
218. Motulsky H. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting / H. Motulsky, A. Christopoulos - Oxford: Oxford University Press, 2004. – 348 p.
219. Moore L.F. Silicon, a required nutrient for *Cladophora glomerata* (L) Kütz. (Chlorophyta) / L.F. Moore, J.A. Traquair // *Planta*. – 1976. – Vol. 128, iss. 2. – P. 179-182.
220. Moran N.A. Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoids production in aphids / N.A. Moran, T. Jarvik // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – P. 624-627.

221. Mori K. Fucoxanthin and its metabolites in edible brown algae cultivated in deep seawater / K. Mori, T. Ooi, M. Hiraoka, N. Oka, H. Hamada, M. Tamura // *Marine Drugs*. – 2004. – Vol. 2. – P. 63-72.
222. Morita M. Chemical form of arsenic in marine macroalgae / M. Morita, Y. Shibata // *Applied organometallic chemistry*. – 1990. – Vol. 4, iss. 3. – P. 181-190.
223. Nakazawa Y. Comparative evaluation of growth inhibitory effect of stereoisomers of fucoxanthin in human cancer cell lines / Y. Nakazawa, T. Sashima, M. Hosokawa, K. Miyashita // *J. Functional Foods*. – 2009. – Vol. 1, iss. 1. – P. 88-97.
224. Neumann C.S. Halogenation strategies in natural product biosynthesis / C.S. Neumann, D.G. Fujimori, C.T. Walsh // *Chem. Biol.* – 2008. – Vol. 15. – P. 99-109.
225. Nishikawa S. Fucoxanthin promotes translocation and induction of glucose transporter 4 in skeletal muscles of diabetic/obese KK–Ay mice / S. Nishikawa, M. Hosokawa, K. Miyashita // *Phytomedicine*. – 2012. – Vol. 19. – P. 389-394.
226. Nomura M. Seasonal variations of total lipids, fatty acid composition, and fucoxanthin contents of *Sargassum horneri* (Turner) and *Cystoseira hakodatensis* (Yendo) from the northern seashore of Japan / M. Nomura, H. Kamogawa, E. Susanto, C. Kawagoe, H. Yasui, N. Saga, M. Hosokawa, K. Miyashita // *J. Appl. Phycol.* – 2013. – Vol. 25. – P. 1159-1169.
227. Nomura T. Proton–donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1–diphenyl–2–picrylhydrazyl (DPPH) / T. Nomura, M. Kikuchi, A. Kubodera, Y. Kawakami // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1997. – Vol. 42. – P. 361-370.
228. Parker B.C. Occurrence of silica in brown and green algae / B.C. Parker // *Canadian Journal of Botany*. – 1969. – Vol. 47, iss. 4. – P. 537-540.
229. Parmar P. Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress / P. Parmar, N. Kumari, V. Sharma // *Botanical studies*. – 2013. – Vol. 54, iss. 1. – P. 45.
230. Patarra R.F. Fatty acid composition of selected macrophytes / R.F. Patarra, J. Leite, R. Pereira, J. Baptista, A.I. Neto // *Nat. Prod. Res.* – 2013. Vol. 27. – P. 665-669.

231. Peng J. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health / J. Peng, J.P. Yuan, C.F. Wu, J.H. Wang // *Marine Drugs*. – 2011. – Vol. 9. – P. 1806-1828.

232. Pfeifroth U. Surface radiation data Set–Heliosat (SARAH) / U. Pfeifroth, S. Kothe, R. Müller, J. Trentmann, R. Hollmann, P. Fuchs, M. Werscheck // *Satellite Application Facility on Climate Monitoring*. – 2017. – Ed. 2. doi: 10.5676/EUM_SAF_CM/SARAH/V002.

233. Pinto E. Heavy metal–induced oxidative stress in algae / E. Pinto, T. Sigaud-kutner, M.A. Leitao, O.K. Okamoto, D. Morse, P. Colepicolo // *Journal of Phycology*. - 2003. – Vol. 39, iss. 6. – P. 1008-1018.

234. Piovan A. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: Photostability and coextractive effects / A. Piovan, R. Seraglia, B. Bresin, R. Caniato, R. Filippini // *Molecules*. – 2013. - Vol. 18. – P. 6298-6310.

235. Rai L.C. Physiology and heavy–metal pollution / L.C. Rai, J.P. Gaur, H. Kumar // *Biol.Rev.* – 1981. – Vol. 56. – P. 99-151.

236. Rainbow P.S. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments / P.S. Rainbow // *Australas. J. Ecotoxicol.* – 2006. – Vol. 12. – P. 107-122.

237. Rajapakse N. Nutritional and digestive health benefits of seaweed / N. Rajapakse, S.-K. Kim // *Adv. Food Nutr. Res.* – 2011. – Vol. 64. – P. 17-28.

238. Ratana-Arporn P. Nutritional evaluation of tropical green seaweeds *Caulerpa lentillifera* and *Ulva reticulata* / P. Ratana-arporn, A. Chirapart // *Kasetsart Journal: Natural Sciences*. – 2006. – Vol. 40. – P. 75-83.

239. Ritter A. Transcriptomic and metabolomic analysis of copper stress acclimation in *Ectocarpus siliculosus* highlights signaling and tolerance mechanisms in brown algae / A. Ritter, S.M. Dittami, S. Goulitquer, J.A. Correa, C. Boyen, P. Potin, T. Tonon // *BMC plant biology*. – 2014. – Vol. 14. – P. 116.

240. Rodnyi P.A. Optical and luminescence properties of zinc oxide (Review) / P.A. Rodnyi, I.V. Khodyuk // *Optics and Spectroscopy*. – 2011. – Vol. 111, iss. 5. – P. 776-785.

241. Rubinelli P. Cadmium- and iron-stress-inducible gene expression in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: evidence for H43 protein function in iron assimilation / P. Rubinelli, S. Siripornadulsil, F. Gao-Rubinelli, R.T. Sayre // *Planta*. – 2002. – Vol. 215, iss. 1. – P. 1-13.

242. Ryabushko V. Fucoxanthin of the brown alga *Cystoseira barbata* (Stackh.) C. Agardh from the Black Sea / V. Ryabushko, A. Prazukin, E. Popova, M. Nekhoroshev // *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*. – 2014. – Vol. 20, no. 2. – P. 108-113.

243. Ryabushko V.I. Functional role of fucoxanthin and phytohormones in brown algae / V.I. Ryabushko, L.I. Musatenko, L.V. Voytenko, E.V. Popova, M.V. Nechoroshev // *Intern. J. on Algae*. – 2015. – Vol. 17, iss. 1. – P. 68-81.

244. Ryabushko V.I. Fucoxanthin and heavy metals in brown algae of genus *Cystoseira* C. Agardh from water areas with different anthropogenic influences (Black sea) / V.I. Ryabushko, A.V. Prazukin, E.V. Gureeva, N.I. Bobko, N.G. Kovrigina, M. V. Nekhoroshev // *Морской биол. журнал*. – 2017. – Vol. 2, iss. 2. – P. 68-77.

245. Sachindra N.M. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabokites / N.M. Sachindra, E. Sato, H. Maeda, M. Hosokawa, Y. Niwano, M. Kohno, K.J. Miyashita // *Agric. Food Chem.* – 2007. – Vol. 55. – P. 8516-8522.

246. Sahelian R. Fucoxanthin supplement health benefit and adverse effects, dosage, uses – Does a fucoxanthin supplement use lead to weight loss? Does it have side effects? Is it a scam? [электронный ресурс] / R. Sahelian. – Электрон. текстовые дан. – 2012. – Режим доступа: <http://www.raysahelian.com/fucoxanthin.html>, свободный.

247. Saito M. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes / M. Saito, Y. Okamatsu-Ogura, M. Matsushita, K. Watanabe, T. Yoneshiro, J. Nio-Kobayashi, N. Petrovic, T.B. Walden, I.G. Shabalina, J.A. Timmons, B. Cannon, J.J. Nedergaard // *Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 7153-7164.

248. Salem A.B. Natural Products among Brown Algae: The Case of *Cystoseira schiffneri* Hamel (Sargassaceae, Phaeophyceae) / A.B. Salem, G. Di Giuseppe, A. Anesi, S. Hammami, Z. Mighri, G. Guella // Chem. Biodivers. – 2017. – Vol. 14, iss. 4. DOI: 10.1002/cbdv.201600333
249. Satomi Y. Antitumor and cancer-preventative function of fucoxanthin: A marine carotenoid / Y. Satomi // Anticancer Research. – 2017. – Vol. 37, iss. 4. – P. 1557-1562.
250. Savitzky A. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures / A. Savitzky, M.J.E. Golay // Analytical Chemistry. – 1964. – Vol. 36, iss. 8. – P. 1627-1639.
251. Sawidis T. Trace metal concentrations in marine macroalgae from different biotopes in the Aegean Sea / T. Sawidis, M. Brown, G. Zachariadis, I. Sratis // Environment International. – 2001. – Vol. 27, iss. 1. – P. 43-47.
252. Schiavona M. Selenium accumulation and metabolism in algae / M. Schiavona, A. Ertanib, S. Parrasiac, F. Vecchiad // Aquatic Toxicology. – 2017. – Vol. 189. – P. 1-8.
253. Schintu M. Macroalgae and DGT as indicators of available trace metals in marine coastal waters near a lead-zinc smelter / M. Schintu, B. Marras, L. Durante, P. Meloni, A. Contu // Environmental monitoring and assessment. - 2010. – Vol. 167, iss. 1. – P. 653-661.
254. Seo M. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants / M. Seo, T. Koshiba // Trends Plant Sci. – 2002. – Vol. 7. – P. 41-48.
255. Shanab S.M.M. A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid / S.M.M. Shanab, R.M. Hafez, A.S. Fouad // Journal of advanced research. – 2018. – Vol. 11. – P. 3-13.
256. Shanmugam S. Utilizing the electron transfer mechanism of chlorophyll-a under light for controlled radical polymerization / S. Shanmugam, J. Xu, C. Boyer // Chem Sci. – 2015. – Vol. 6, iss. 2. – P. 1341-1349.

257. Shea R. Effects of germanium dioxide, an inhibitor of diatom growth, on the microscopic laboratory cultivation stage of the kelp, *Laminaria saccharina* / R. Shea, T. Chopin // Journal of Applied Phycology. – 2007. – Vol. 19, iss. 1. – P. 27-32.

258. Silberfeld T. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the "brown algal crown radiation" / T. Silberfeld, J.W. Leigh, H. Verbruggen, C. Cruaud, B. de Reviers, F. Rousseau // Molecular phylogenetics and evolution. – 2010. – Vol. 56, iss. 2. – P. 659-674.

259. Silva G. Distinct fatty acid profile of ten brown macroalgae / G. Silva, R.B. Pereira, P. Valenta, P.B. Andrade, C. Sousa // Braz. J. Pharmacog. – 2013. – Vol. 23. – P. 608-613.

260. Simon L. Effects of zirconium on the growth and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa* green algae / L. Simon, M. Fodor, P. István // Journal of Plant Nutrition. – 2001. – Vol. 24, iss. 1. – P. 159-174.

261. Souza P.O. Algae of economic importance that accumulate cadmium and lead: a review / P.O. Souza, C.M.P. Pereira, M.F. Mesko, L.R. Ferreira // Revista Brasileira de Farmacognosia. – 2012. – Vol. 22. – P. 825-837.

262. Sporn M.B. Chemoprevention of cancer / M.B. Sporn, N. Suh // Carcinogenesis. – 2000. – Vol. 21. – P. 525-530.

263. Stahl W. Photoprotection by dietary carotenoids: Concept, mechanism, evidence and future development / W. Stahl, H. Sies // Mol. Nutr. Food Res. – 2012. – Vol. 56. – P. 287-295.

264. Stefanov K. Fatty acid composition of some algae from the Black Sea / K. Stefanov, M. Konaklieva, E.Y. Brechany, W.W. Christie // Phytochemistry. – 1988. – Vol. 27, iss. 11. – P. 3495-3497.

265. Sudhakar M.P. Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds / M.P. Sudhakar, J.S. Ananthalakshmi, B.B. Nair // J. Chem. Pharm. Res. – 2013. – Vol. 5. – P. 169-175.

266. Susanto E. Lipids, fatty acids, and fucoxanthin content from temperate and tropical brown seaweeds / E. Susanto, A.S. Fahmi, M. Abe, M. Hosokawa, K. Miyashita // *Aquatic Procedia*. – 2016. – Vol. 7. – P. 66-75.

267. Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions / S. Takaichi // *Marine Drugs*. – 2011. – Vol. 9. – P. 1101-1108.

268. Takeuchi Y. Light-harvesting properties of zinc complex of chlorophyll-a from spirulina in surfactant micellar media / Y. Takeuchi, Y. Amao // *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. – 2005. – Vol. 18, iss. 1. – P. 15-21.

269. Tallima H. Arachidonic Acid: Physiological Roles and Potential Health Benefits. A Review / H. Tallima, R. El Ridi // *Journal of advanced research*. – 2017. – Vol. 11. – P. 33-41

270. Tashmukhamedov B.A. Strontium transport system of brown alga *Cystoseira barbata*: reconstitution on bilayer lipid membranes / B.A. Tashmukhamedov, E.M. Makhmudova, N.V. Bespalko, I. Kazakov, G.G. Polikarpov, G.I. Lazarenko // *Gen. Physiol. Biophys.* – 1983. – Vol. 2. – P. 107-110.

271. Tedetti M. Penetration of ultraviolet radiation in the marine environment. A review / M. Tedetti, R. Sempere // *Photochemistry and photobiology*. – 2006. – Vol. 82, iss. 2. – P. 389-97.

272. Terasaki M. Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (Phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents / M. Terasaki, A. Hirose, B. Narayan, Y. Baba, C. Kawagoe, H. Yasui, K. Miyashita // *J. Phycology*. – 2009. – Vol. 45, iss. 4. – P. 974-980.

273. Topcuoğlu S. Heavy metal monitoring of marine algae from the Turkish Coast of the Black Sea, 1998–2000 / S. Topcuoglu, K. Güven, N. Balkıs, Ç. Kırbaşoğlu // *Chemosphere*. – 2003. – Vol. 52, iss. 10. – P. 1683-1688.

274. Topcuoğlu S. Heavy metal levels in biota and sediments in the northern coast of the Marmara Sea / S. Topcuoglu, Ç. Kırbaşoğlu, Y.Z. Yilmaz // *Environmental monitoring and assessment*. – 2004. – Vol. 96, iss. 1. – P. 183-189.

275. Tsukui T. Fucoxanthin and fucoxanthinol enhance the amount of docosahexaenoic acid in the liver of KKAY obese/diabetic mice / T. Tsukui, K. Konno, M. Hosokawa, H. Maeda, T. Sashima, K. Miyashita // J. Agric. Food Chem. – 2007. – Vol. 55. – P. 5025-5029.

276. Turner A. Selenium in sediments and biota from estuaries of southwest England // Mar. Pollut. Bull. – 2013. – Vol. 73. – P. 192-198.

277. Tuzen M. Trace element content in marine algae species from the Black Sea, Turkey / M. Tuzen, B. Verep, A.O. Ogretmen, M. Soylak // Environmental monitoring and assessment. – 2009. – Vol. 151, iss. 1-4. – P. 363-368.

278. Urikura I. Protective effect of fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice / I. Urikura, T. Sugawara, T. Hirata // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2011. – Vol. 75. – P. 757-760.

279. Varma R. Bioaccumulation of metals by *Fucus ceranoides* in estuaries of South West England / R. Varma, A. Turner, M.T. Brown // Marine pollution bulletin. - 2011. – Vol. 62, iss. 11. – P. 2557-2562.

280. Villares R. Seasonal variation and background levels of heavy metals in two green seaweeds / R. Villares, X. Puente, A. Carballeira // Environ. Pollut. – 2002. – Vol. 119, iss. 1. – P. 79-90.

281. Vishnevetsky M. Carotenoid sequestration in plants: The role of carotenoid-associated proteins / M. Vishnevetsky, M. Ovadis, A. Vainstein // Trends Plant Sci. – 1999. – Vol. 4. – P. 232-235.

282. Vizetto-Duarte C. Fatty acid profile of different species of algae of the *Cystoseira* genus: a nutraceutical perspective / C. Vizetto-Duarte, H. Pereira, C. Bruno de Sousa, A. Pilar Rauter, F. Albericio, L. Custódio, J. Varela // Natural product research. – 2015. – Vol. 29, iss. 13. – P. 1264-1270.

283. Volterra L. Algae as biomarkers, bioaccumulators and toxin producers / L. Volterra, M.E. Conti // International Journal of Environment and Pollution. – 2000. – Vol. 13, iss. 1-6. – P. 92-125.

284. Vollenweider R. Characterization of the trophic conditions of marine coastal waters with special reference to the NW Adriatic Sea: proposal for a trophic scale,

turbidity and generalized water quality index / R. Vollenweider, F. Giovanardi, G. Montanari, A. Rinaldi // *Environmetrics*, 1998, vol. 9, pp. 329–357.

285. Walker C.G. Stearidonic acid as a supplemental source of omega-3 polyunsaturated fatty acids to enhance status for improved human health / C.G. Walker, S.A. Jebb, P.C. Calder // *Nutrition*. – 2013. – Vol. 29, iss. 2. – P. 363-369.

286. Wang J. In vivo induction of apoptosis by fucoxanthin, a marine carotenoid, associated with down-regulating STAT3/EGFR signaling in sarcoma 180 (S180) xenografts-bearing mice / J. Wang, S. Chen, S. Xu, X. Xu, D. Ma, X. Hu, X. Cao // *Marine Drugs*. – 2012. – V. 10. – P. 2055-2068.

287. Wang W.J. Isolation of fucoxanthin from the rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch / W.J. Wang, G.C. Wang, M. Zhang, C.K. Tseng // *J. Integr. Plant. Biol.* – 2005. – Vol. 47. – P. 1009-1015.

288. Willstatter R. Chlorophyll. XXIV. The pigments of the brown algae / R. Willstatter, H.J. Page // *Justus Liebigs Ann. Chem.* – 1914. – Vol. 404. – P. 237-271.

289. Woo M.N. Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice / M.N. Woo, S.M. Jeon, H.J. Kim, M.K. Lee, S.K. Shin // *Chem. Biol. Interact.* – 2010. – Vol. 186. – P. 316-322.

290. Wu C.Y. A preliminary comparative study of the productivity of three economic seaweeds / C.Y. Wu, Z. Wen, Z. Peng, J. Zhang // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. – 1984. – Vol. 2. – P. 97-101.

291. Wu J. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human / J. Wu, P. Bostrom, L.M. Sparks, L. Ye, J.H. Choi, A.H. Giang, M. Khandekar M. // *Cell*. – 2012. – Vol. 150. – P. 366-376.

292. Yan X. Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed / X. Yan, Y. Chuda, M. Suzuki, T. Nagata // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 1999. – Vol. 63. – P. 605-607.

293. Yoshida N. Identification and characterization of heavy metal-resistant unicellular alga isolated from soil and its potential for phytoremediation / N. Yoshida, R. Ikeda, T. Okuno // *Bioresource Technology*. – 2006. – Vol. 97. – P. 1843-1849.

294. Yu Q. Heavy metal uptake capacities of common marine macro algal biomass / Q. Yu, J.T. Matheickal, P. Yin, P. Kaewsarn // Water research. – 1999. – Vol. 33, iss. 6. – P. 1534-1537.