

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН
Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Материалы
Всероссийской молодежной гидробиологической конференции

**«ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ
СОВРЕМЕННОЙ ГИДРОБИОЛОГИИ»**

Борок, 2016

Chambrier A., Scholz T., 2016. An emendation of the generic diagnosis of the monotypic *Glanitaenia* (Cestoda: Proteocephalidae), with notes on the geographical distribution of *G. osculata*, a parasite of invasive wels catfish // *Revue suisse de Zoologie*. V. 123 (1). P. 1–9.

УДК 582.273:577.1

И.А. Харчук

ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», г. Севастополь
e-mail: seaferm@yandex.ru

Выбор способа перевода в состояние ангидробиоза красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*

Резюме. Красная морская микроводоросль *Porphyridium purpureum* была переведена в состояние анабиоза с помощью обезвоживания и замораживания. В данном состоянии клетки пребывали 2 года. Биохимический анализ показал, что при длительном хранении культур микроводорослей в обезвоженном состоянии при температуре 20–22°C и в морозильной камере при температуре -14°C, происходит изменение в содержании в биохимических компонентах клеток. Применение протекторов препятствует деградации биохимических веществ в клетке и способствует сохранению их жизнеспособности. Так, отмечено, что добавление в культуру водорослей сахаров (1% растворов сахарозы и глюкозы) перед обезвоживанием сокращает количество разрушающихся пигментов, РНК, липидов и белков. Экспериментальным путём установлено, что использование экзополисахаридов синтезируемых клетками *Porphyridium purpureum* в процессе их жизнедеятельности, в качестве криопротекторов, повышает сохранность пигментного комплекса, липидов и углеводов, белков и РНК, а использование 10% глицерина предохраняет от деструкции каротиноиды и РНК. Доля сохраняющихся биохимических компонентов в клетках водоросли позволяет им сберечь свою жизнеспособность в состоянии анабиоза, а при реактивации восстановить биосинтетические процессы в клетках и приступить к делению, и росту клеток.

Одним из методов сохранения микроводорослей является перевод клеток в состояние анабиоза. В это состояние клетки можно перевести путём их обезвоживания или замораживания. Оба способа максимально приближены к естественным, распространены в природе и являются экономически доступными. При соблюдении определённых условий обеспечивают долгосрочное хранение культур с поддержанием высокой жизнеспособности и без мутационных изменений. Цель работы – перевести клетки красной морской микроводоросли *Porphyridium purpureum* в состояние анабиоза путём обезвоживания и замораживания с использованием защитных веществ, и реактивировать их после продолжительного периода хранения.

Объектом исследования была культура *Porphyridium purpureum* (штамм IBSS–70), из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ИМБИ РАН. Микроводоросли культивировали в накопительном режиме, при постоянном круглосуточном освещении и автоматическом перемешивании с использованием насоса для удаления избытка кислорода из среды и равномерного прогрева всего слоя питательного раствора культуры. Интенсивность света на поверхности раствора составляла 8 кЛк. Температура среды колебалась в диапазоне 25–29°C. В качестве питательной среды для *P. purpureum* использовали среду Тренкеншу. Объём среды в культиваторах составлял 5 л, при высоте слоя раствора 45 см. На стационарной фазе роста культуру микроводорослей разделяли на две части. Первую половину водорослей обезвоживали в температурном диапазоне 35–45°C. Исследуемые образцы отличались друг от друга протекторами, добавленными к пасте микроводорослей перед дегидратацией. В первом варианте к клеткам добавляли 10% глицерин, который вносили в культуру за 24 часа до обезвоживания. Во втором варианте, клетки высушивали с добавлением раствора 1% глюкозы.

В третьем варианте – с добавлением раствора 1% сахарозы. В четвёртом варианте – без протекторов. Вторая половина водорослей подлежала замораживанию. Культуру клеток делили на три равные части. В первом варианте к клеткам добавляли 10% глицерин, который вносили в культуру за 24 часа до закладки в морозильную камеру. Во втором варианте, клетки замораживали с дополнительно внесёнными природными полисахаридами, которые микроводоросли синтезировали в процессе своего роста и были выделены при центрифугировании клеток. В третьем варианте, клетки, были заморожены без протекторов. Полученную пасту водорослей помещали в герметичные пластиковые боксы и ставили в морозильную камеру (-14°C). Перед закладкой на хранение проводили биохимические исследования. Срок пребывания клеток в обезвоженном и замороженном состоянии на момент исследования составлял 2 года.

Биохимический анализ клеток *P. purpureum* обезвоженных с разными веществами, добавленными в качестве протекторов, выявил, что низкомолекулярные соединения (сахароза, глюкоза и глицерин) при обработке ими клеток микроводорослей оказывают на них протекторное воздействие. Так в культуре, обезвоженной без протектора, отмечено низкое содержание хлорофилла в 2 раза и каротиноидов в 3 раза, по отношению к культурам дегидратированным с протекторами. Сравнительный анализ содержания биохимических компонентов в клетках *P. purpureum*, к которым был добавлен 10% глицерин, зарегистрировал низкое содержание пигментов: хлорофилла – в 3 раза и каротиноидов – в 2 раза, а так же структурных углеводов – в 2 раза по сравнению с культурами обезвоженными с растворами 1% глюкозы и 1% сахарозы. Доля липидов и РНК в клетках обезвоженных как без протектора, так с протекторами была постоянна и не зависела от вида протектора.

Анализ содержания биохимических компонентов культур помещённых в морозильную камеру, выявил, что в клетках водорослей замороженных без протекторов доля каротиноидов и РНК ниже, чем в клетках с предварительно внесённым 10% глицерином. Значения остальных показателей биохимического состава у сравниваемых образцов статистически не отличались. При сравнении с культурой замороженной с природными полисахаридами, отмечено снижение содержания хлорофилла *a*, каротиноидов, липидов, РНК, запасных и структурных углеводов. Сравнительный анализ содержания биохимических компонентов в культурах сохраняемых с полисахаридами и 10% глицерином показал, что в клетках замороженных с 10% глицерином ниже доля хлорофилла *a* (на 38%), каротиноидов (на 26%), липидов (на 53%), свободных нуклеотидов (на 14%) и структурных углеводов (29%), чем в клетках заложенных на хранение с дополнительно внесёнными полисахаридами. Отмечено, что во всех культурах независимо от добавленного протектора так и без него содержание ДНК и белков было статистически одинаково. Известно, что избежать образования льда можно снижением точки замерзания раствора путем накопления электролитов или спиртов типа глицерина, углеводов – сахаров. Глицерин – криопротектор проникающего действия, он препятствует формированию кристаллов за счёт образования водородных связей с молекулами воды. Полисахариды синтезируемые и выделяемые клетками *P. purpureum* в процессе их жизнедеятельности являются естественными криопротекторами, которые стабилизируют клеточные мембраны и содержимое клеток.

Во время реактивации микроводорослей обезвоженных и сохраняемых при температуре 20-22°C, а так же сохраняемых в морозильной камере при температуре -14°C, наблюдали рост и деление реактивированных клеток, что свидетельствует о восстановлении биосинтетических процессов. Ростовые характеристики реактивированных микроводорослей *P. purpureum* и контрольной культуры в различных фазах развития накопительной культуры были практически идентичны.

Таким образом, установлено, что растворы сахарозы и глюкозы проявляют протекторные свойства при обезвоживании *P. purpureum* и препятствуют разрушению пигментов, РНК, липидов и белков. Определено, что использование экзополисахаридов, синтезируемых микроводорослью *P. purpureum* в процессе роста, сокращает деградацию пигментного комплекса, липидов и структурных углеводов при замораживании. Доля

сохраняющихся биохимических компонентов в клетках водоросли позволяет им сберечь свою жизнеспособность в состоянии анабиоза, а при реактивации восстановить биосинтетические процессы в клетках и приступить к делению, и росту клеток.

УДК 574.24:594.124

Н.С. Челядина¹, Н.В. Поспелова¹, М.А. Попов¹,
Л.Л. Смирнова², И.А. Харчук¹, В.И. Рябушко¹

¹ ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН», г. Севастополь

² Севастопольское отделение ФГБУ «Государственный Океанографический институт им. Н.Н. Зубова», г. Севастополь

Инверсия пола мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam., культивируемой у берегов Крыма (Чёрное море)

Резюме. В последние годы отмечается сдвиг половой структуры в популяции черноморской мидии *M. galloprovincialis*, как в сторону преобладания самцов, так и самок. Проведенные экспериментальные исследования в районе мидийно-устричной фермы (г. Севастополь) показали сдвиг соотношения полов у мидий в сторону преобладания самцов. Самки поменяли пол после весеннего нереста: в загрязнённой акватории доля самцов составила 75%, а в чистом открытом море 38%. Инверсия пола была связана с различными экологическими условиями. У самцов смены пола не произошло.

Для промышленного культивирования мидий большое значение имеют знания об их биологии, в т.ч. о сроках нереста и половой структуре. Мидии, как большинство двустворчатых моллюсков, являются раздельнополыми. Половая структура поселений мидий определяет не только количественные показатели популяции, но и качество продукции, производимой из этих моллюсков. Обычно соотношение полов у черноморской мидии во все сезоны года составляет 1:1 при 1-3% гермафродитов (Кудинский и др., 1985; Монин, Золотницкий, 1986; Пиркова и др., 1994; Иванов, 2007). Однако в последние годы появились публикации, где описывается сдвиг половой структуры поселений мидии, как в сторону преобладания самцов, так и самок (Шурова, 2001; Пиркова, 2006; Караванцева, 2009; Челядина, 2015). Отмечено, что соотношение самцов и самок в популяции мидий зависит как от генетических механизмов формирования пола, так и от экологических условий среды (Lee, 2015). Объяснение генетических механизмов этого процесса противоречиво (Saavedra et al., 1997). Высказано предположение, что к экологическим факторам, влияющим на соотношение пола моллюсков, можно отнести солёность, расположение в друзе, интенсивность водообмена и т. д. (Шурова, 2001). Однако информация о смене пола в процессе онтогенеза у *M. galloprovincialis* практически отсутствует.

Цель работы: проанализировать соотношение полов у *M. galloprovincialis* и выявить факт смены пола у особей данного вида в период посленерестовой перестройки гонад.

Мидий (размером 40-60 мм) отбирали ежемесячно на ферме, расположенной на внешнем рейде г. Севастополя с экспериментального верёвочного коллектора (глубина 6 м), с марта 2015 по июнь 2016 года. Всего обработано 2800 мидий. Для исследования инверсии пола в период весеннего массового размножения проводили стимуляцию нереста в лабораторных условиях индивидуально для каждого моллюска (Пиркова, 1994). Для определения пола использовали методику визуального изучения мазков гонад под микроскопом. Отобранных самок и самцов (гермафродитов не учитывали) помещали в отдельные сетки (по 50 экз. в каждой) и вывешивали в загрязнённой акватории (станция 1), отделенной молом от открытой части моря, а также на ферме (станция 2). Пол моллюсков определяли через шесть месяцев.

При анализе половой структуры соотношение полов составляло 1:1.7 (♀:♂) в марте, а к августу 2015 года, по мере роста моллюсков на коллекторе, сдвиг в сторону преобладания