



УДК 582.261.1

МОДИФИКАЦИЯ СРЕДЫ ESAW, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МОРСКИХ ДИАТОМОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

© 2018 г. С. Л. Полякова, О. И. Давидович, Ю. А. Подунай, Н. А. Давидович

Карадагская научная станция имени Т. И. Вяземского — природный заповедник РАН, Феодосия, Россия

E-mail: karadag-algae@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.03.2018; после доработки 23.04.2018;
принята к публикации 27.04.2018; опубликована онлайн 29.06.2018.

Эксперименты с клоновыми культурами четырёх видов пенистых диатомовых водорослей, *Haslea karadagensis*, *H. ostrearia*, *Pleurosigma* sp. и *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata*, показали, что добавление в среду ESAW тиосульфата натрия приводит к увеличению темпа деления клеток. Наибольшее, почти двукратное, увеличение темпов деления (по сравнению с таковым при использовании обычного состава среды) отмечено у *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata* — представителя рода, включающего токсигенные виды. Изучена зависимость темпов деления от концентрации тиосульфата натрия в среде. Определены оптимальные концентрации, обеспечивающие наивысший темп деления. Добавление аммонийного цитрата железа или замена им хлорида железа не сказывались на темпах деления изученных диатомей. В практических целях целесообразнее готовить среду солёностью 36‰. Приведён модифицированный рецепт среды ESAW.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, культивирование, искусственные среды, тиосульфат натрия

Диатомовые представляют собой одну из наиболее богатых видами и широко распространённую группу эукариотических микроводорослей. Они обладают рядом уникальных свойств, которые привлекают внимание исследователей и тех, кто заинтересован в их практическом применении. В основе экспериментальных исследований (молекулярно-генетический анализ, изучение химического состава, репродукции, жизненных циклов), так же как и в большей части биотехнологий, лежит культивирование водорослей. В связи с этим использование подходящей для культивирования среды становится базовым, а в ряде случаев — ключевым аспектом в методическом плане.

Первую попытку выращивания водорослей с использованием растворов нескольких неорганических солей предпринял русский физиолог растений А. С. Фаминцын из Санкт-Петербурга [8] (цит. по: [17]). За истекшие 150 лет разработаны и опробованы десятки рецептов, описание которых можно найти во множестве источников [1, 2, 6, 12, 13, 16] (и др.). Среди этих рецептов есть как «специализированные», наилучшим образом адаптированные к определённым группам водорослей, так и «универсальные», подходящие для большинства видов. Из сред, используемых для культивирования морских диатомей, особое место занимают так называемые синтетические, или искусственные, среды, т. е. приготовленные на основе дистиллированной (деионизированной, ключевой, талой) воды, минеральных солей, состав которых должен обеспечивать соотношение основных ионов, такое же, как в природной воде, и дополнительных биогенных элементов и витаминов. Наибольшую известность получили такие синтетические среды, как Aquil [18], ASP [19], DAM [10], ESAW [14] и некоторые

другие. Состав сред продолжает модифицироваться [13]. Попытки усовершенствования привели к ситуации, анализируя которую Дж. Маклахлен (J. McLachlan) справедливо заметил: «Были разработаны многочисленные обогащённые и синтетические среды, число которых вместе с обычно тривиальными модификациями почти равно количеству исследователей» [16].

Модифицированная среда ESAW [3] успешно применяется в лаборатории водорослей и микробиоты Карадагской научной станции с октября 2006 г., являясь основной средой для содержания морских диатомовых водорослей [4]. Она обеспечивает их рост на всех этапах жизненного цикла, включая генеративную фазу. Изучая характеристики роста в культуре представителей токсикогенного рода *Pseudo-nitzschia* H. Peragallo, мы обнаружили сильное позитивное действие на водоросли добавляемого к среде тиосульфата натрия. Полученные результаты дали нам основание предложить дальнейшее усовершенствование состава среды ESAW.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследований использованы клоновые культуры четырёх видов диатомовых водорослей. Три из них (*Haslea karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget, *Haslea ostrearia* (Bory) Simonsen, *Pleurosigma* sp.) являются бентосными, один вид (*Pseudo-nitzschia* cf. *seriata* (Cleve) H. Peragallo) — планктонным. Все изучавшиеся виды относятся к шовным пеннатным. Распространены широко, в том числе в Чёрном море (за исключением *Haslea ostrearia*); регулярно встречаются у берегов Карадага. Клоны *H. karadagensis* и *Pleurosigma* sp. выделены из проб, взятых в виде соскоба обрастаний с камней на глубине 0,2–0,5 м. *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata* изолирована из планктонных проб, отобранных с помощью малой сети Джели в акватории Карадагского заповедника (бухта Львиная). Клоны выделяли микропипеточным способом [7] и содержали в конических колбах Эрленмейера объёмом 100 мл. Использовали среду ESAW [3] солёностью 18‰ для черноморских клонов *H. karadagensis*, *P. cf. seriata*, *Pleurosigma* sp., 30‰ — для *Pleurosigma* sp. из Мраморного моря, 36‰ — для океанической *H. ostrearia*.

Эксперименты выполняли, засевая культуры в чашки Петри диаметром 10 см, в объёме среды 20 мл. Для экспериментов к среде ESAW добавляли тиосульфат натрия в виде кристаллогидрата $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в разных концентрациях (от 0 до $12 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Контролем служили чашки, в которые тиосульфат натрия не добавлялся. Было выполнено также несколько экспериментов по изучению зависимости темпа деления водорослей от присутствия в среде цитрата железа ($0,36 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) — дополнительного компонента, которого нет в оригинальном рецепте. Чашки содержали в изолированной комнате при постоянной температуре (20 ± 1) °С и естественном освещении со стороны северных окон, не допуская засветки прямыми солнечными лучами. Действие добавок тиосульфата натрия и цитрата железа на вегетативный рост оценивали по внешнему виду клеток и хлоропластов и по темпу деления клеток в культуре (r , делений⁻¹). Последний рассчитывали, исходя из уравнения экспоненциального роста численности клеток:

$$N_t = N_0 \exp(rt), \quad (1)$$

где N_t и N_0 — число клеток в момент времени t и в начальный момент времени t_0 соответственно.

После преобразования уравнения (1) к линейному виду значение коэффициента r линейной регрессии рассчитывали методом наименьших квадратов по четырём-пяти точкам, соответствующим дням подсчёта численности клеток, которую определяли как среднее значение для 30–35 полей зрения микроскопа в первой и 15 полей зрения во второй серии экспериментов. Чтобы выразить темп деления в единицах (делений·сутки⁻¹), полученные значения делили на $\ln(2)$.

Эксперименты выполняли в трёх повторностях, рассчитывая средние значения (M), ошибки среднего (SE) и доверительные интервалы для уровня значимости $p = 0,05$. В тексте и таблицах средние значения представлены в виде $M \pm SE$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов добавление в среду тиосульфата натрия в концентрации $4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ привело к увеличению темпов деления всех изученных водорослей (табл. 1). При этом коэффициент увеличения темпа деления по сравнению с контролем был неодинаков для разных видов. В наименьшей степени отреагировали представители рода *Haslea*, у которых темп деления практически не изменился. В то же время темп деления *Pseudo-nitzschia cf. seriata* при добавлении тиосульфата натрия в указанной концентрации возрос почти вдвое.

Таблица 1. Темп деления, делений-сутки⁻¹, некоторых видов диатомовых водорослей при добавлении в среду тиосульфата натрия

Table 1. Growth rate, division-day⁻¹, of some diatom algae in the culture medium with sodium thiosulfate added

Вид	Клон	Наличие в среде тиосульфата натрия		Коэффициент увеличения темпа деления
		отсутствует	$4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$	
<i>Haslea karadagensis</i>	7.0630-A	$0,63 \pm 0,05$	$0,67 \pm 0,06$	1,06
<i>Haslea ostrearia</i>	9AA4	$0,88 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,04$	1,09
<i>Pleurosigma</i> sp.	7.0706-Z	$0,55 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,02$	1,24
“”	7.0313-E	$0,37 \pm 0,05$	$0,58 \pm 0,02$	1,57
<i>Pseudo-nitzschia cf. seriata</i>	7.0804-Si5	$0,56 \pm 0,25$	$1,08 \pm 0,18$	1,93

Вторая серия экспериментов была направлена на изучение зависимости темпа деления двух видов диатомовых, *Haslea karadagensis* и *Pseudo-nitzschia cf. seriata*, от концентрации в среде тиосульфата натрия. Заданная градация в диапазоне от $0,0$ до $12,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ с интервалом $2,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ показала, что даже при незначительном ($1,0$ – $2,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) добавлении в среду тиосульфата темп деления клеток возрастал, достигая максимума при концентрации $4,0$ – $5,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. С увеличением концентрации тиосульфата натрия до $6,0$ – $8,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ происходило существенное замедление темпа деления клеток. Ещё более выраженным (темп деления меньше, чем в среде без добавления тиосульфата) замедление становилось при $10,0$ – $12,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$.

Зависимость, таким образом, имеет характер одновершинной кривой. Приблизительную аппроксимацию можно выполнить кривыми Лоренца (рис. 1), которые указывают на соответствие максимумов темпа деления клеток концентрации тиосульфата натрия в пределах $4,0$ – $5,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. У всех видов добавление в среду тиосульфата натрия приводило к заметному улучшению состояния культуры: хлоропласты приобретали характерный цвет и типичные для вида форму и положение, равномерно распределялись в клетке. Клетки активно двигались по поверхности субстрата. Добавление в среду тиосульфата натрия привело к «оздоровлению» нескольких культур, контаминированных золотистыми водорослями и грибами и считавшихся фактически погибшими (рис. 2).

Тиосульфат натрия присутствует в рецептурах лишь немногих сред, например в среде Рощина [5], успешно применявшейся для содержания диатомовых. Тиосульфат натрия служит источником необходимой клеткам серы. Также он может быть задействован в других процессах, например в ионном транспорте. Так, в присутствии тиосульфата натрия заметно возросла способность проникновения в клетку зелёных микроводорослей ионов серебра [9, 15], которые, как известно, оказывают токсическое действие [15, 20]. Высказано предположение, что серебро переносится через клеточную мембрану посредством сульфат/тиосульфат транспортной системы и что сульфат действует как конкурентный ингибитор в этом механизме [9]. Можно предположить, что у диатомовых водорослей тиосульфат натрия также задействован в переносе некоторых ионов, что повышает эффективность их поступления в клетку.

Очень широко тиосульфат натрия используют для нейтрализации остатков хлора при обеззараживании воды, подготавливаемой для питательных сред [2]. При этом было показано, что тиосуль-

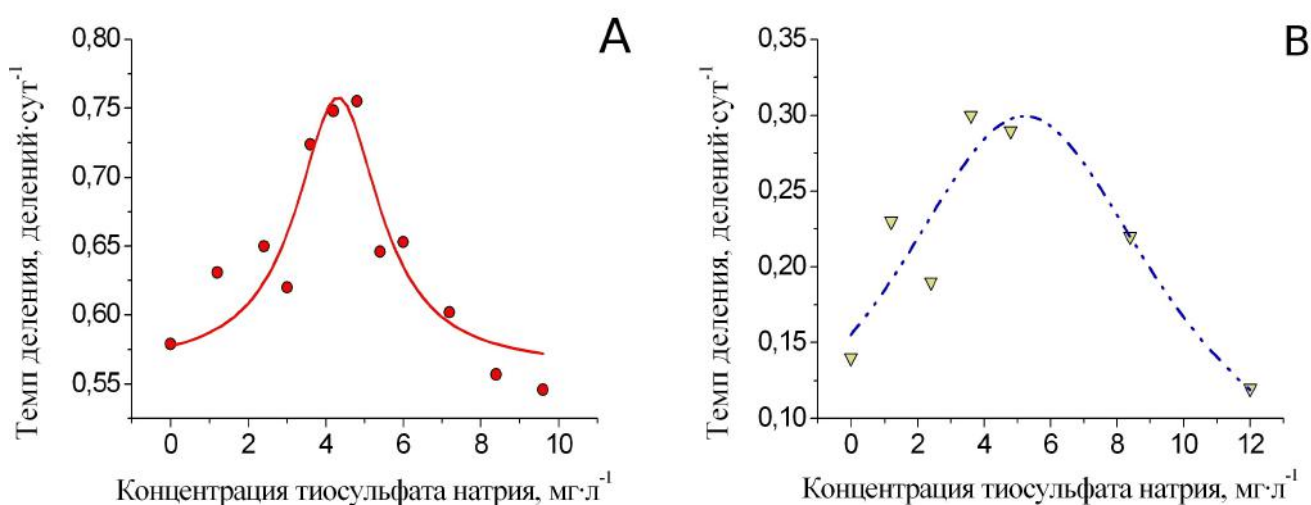


Рис. 1. Зависимость темпа деления клеток *Haslea karadagensis* (A) и *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata* (B) от концентрации тиосульфата натрия в среде ESAW. Аппроксимация выполнена кривыми Лоренца

Fig. 1. Dependence of the growth rate of *Haslea karadagensis* (A) and *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata* (B) on sodium thiosulfate concentration. Approximation is performed with Lorenz curves use

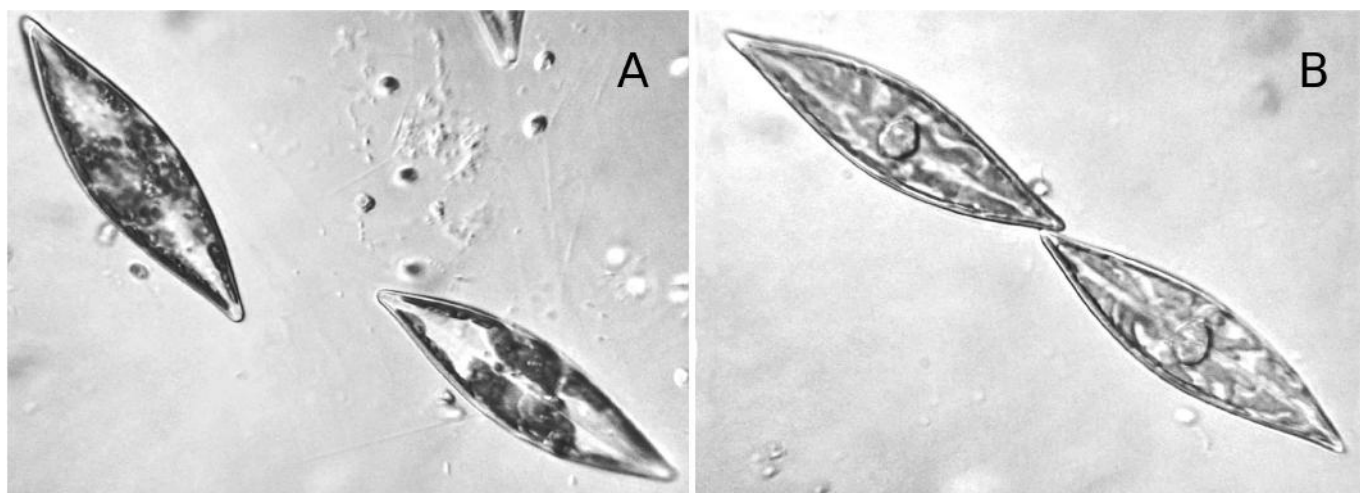


Рис. 2. Внешний вид клеток *Pleurosigma* sp. в среде ESAW без добавления (A) и в присутствии (B) тиосульфата натрия

Fig. 2. Total view of *Pleurosigma* sp. cells in ESAW medium – without addition (A) and in the presence (B) of sodium thiosulfate

натрия, добавленный в избытке, не ингибировал рост культивируемых водорослей; они, напротив, достигали большего уровня продуктивности при длительном культивировании [11].

В некоторых средах в качестве компонента, содержащего железо, применяют аммонийный цитрата железа [7]. Наши эксперименты продемонстрировали отсутствие различий в темпах деления клеток в средах с разным составом железосодержащих соединений (табл. 2). Дополнительное присутствие в среде аммонийного цитрата железа либо замена хлорида железа цитратом железа не приводили ни к увеличению, ни к падению темпов деления исследованных видов водорослей. Следовательно, железо в составе среды может быть представлено только одним компонентом. По нашему мнению, предпочтение следует отдать, в соответствии с оригинальным рецептом [6], хлориду железа, раствор которого в присутствии ЭДТА стабилен, не образует осадка и может быть использован в течение длительного времени после приготовления.

Таблица 2. Темп деления, делений·сутки⁻¹, некоторых видов диатомовых водорослей при различном составе в среде железосодержащих компонентов

Table 2. Growth rate, division·day⁻¹, of some diatom algae in a culture medium with different composition in the medium of iron-containing components

Вид	Клон	Железосодержащий компонент в среде		
		FeCl ₃ ·6H ₂ O ^{а)}	FeCl ₃ ·6H ₂ O ^{а)} + Fe-цитрат аммонийный ^{б)}	Fe-цитрат аммонийный ^{б)}
<i>Haslea karadagensis</i>	7.0630-A	0,88 ± 0,03	–	0,78 ± 0,04
<i>Haslea ostrearia</i>	9AA4	0,84 ± 0,07	0,92 ± 0,04	–
<i>Pleurosigma</i> sp.	6.1020-L	0,32 ± 0,05	0,18 ± 0,14	–
“”	7.0313-E	0,75 ± 0,09	–	0,72 ± 0,03
<i>Pseudo-nitzschia</i> cf. <i>seriata</i>	7.0804-Si5	1,10 ± 0,06	1,01 ± 0,02	–

Примечание. «–» — нет данных; ^{а)} — в концентрации 1,77 мг·л⁻¹; ^{б)} — в концентрации 0,36 мг·л⁻¹

Note. ‘–’ – no data; ^{a)} – concentration 1.77 mg·l⁻¹; ^{b)} – concentration 0.36 mg·l⁻¹

С точки зрения практического применения важна общая солёность получаемой среды. Согласно описанию оригинального рецепта [6] (с. 494), удельная плотность среды при температуре 20 °С составляет 1,021, что соответствует 30‰. Среду с таким уровнем солёности невозможно использовать, когда речь идёт об океанических видах, для которых нормой являются 35–36‰. Двукратное разбавление практически более удобно в случае, когда необходимо приготовить среду для черноморских видов (18‰). Ниже приведён модифицированный, с добавлением тиосульфата натрия, рецепт среды ESAW солёностью 36‰ (табл. 3, 4, 5). Базовый раствор тиосульфата натрия хранят в плотно закрытой ёмкости в защищённом от света месте, чтобы не допустить помутнения вследствие выпадения серы. Для стабилизации тиосульфата натрия, подвергающегося гидролизу, в базовый раствор вносят небольшое количество карбоната натрия. Предпочтение следует отдавать свежеприготовленному раствору.

Среду готовят на основе дистиллированной воды из химически чистых солей, добавляемых в последовательности, которая указана в рецепте. На следующий день после приготовления среду разливают в стеклянные, плотно закрывающиеся ёмкости и стерилизуют, последовательно три дня подряд нагревая в водяной бане до температуры 62–64 °С, а затем охлаждая. Метод известен как тиндализация [2]. На третий день среда, остывшая до комнатной температуры, готова к применению. Стерилизованная указанным способом среда может храниться в течение нескольких месяцев. Для получения меньшей солёности базовую среду (36‰) асептически разбавляют дистиллированной водой в необходимой пропорции.

Эффект заметного увеличения темпов деления диатомовых водорослей, наблюдавшийся при добавлении в среду тиосульфата натрия, может найти практическое применение при их массовом производственном культивировании.

Выводы:

1. Добавление в среду ESAW, используемую для культивирования морских диатомовых, тиосульфата натрия увеличивает темп деления водорослей и улучшает состояние культур.
2. У разных видов водорослей наблюдалась различная степень увеличения темпа деления. Наибольший (двукратный) прирост темпа деления отмечен у *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata*.
3. Оптимальная концентрация тиосульфата натрия в среде для изученных видов близка к 4–5 мг·л⁻¹.

Работа поддержана грантом Министерства образования, науки и молодёжи Республики Крым, Соглашение № 2181/2017 от 29.11.2017, и региональным грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 17-44-92021 p_a «Диатомовые рода *Pseudo-nitzschia*: распространение у берегов Крыма, жизненный цикл, токсикогенная активность» (№ гос. регистрации АААА-А18-118032090122-1).

Таблица 3. Оригинальный [7] и модифицированный составы среды ESAW**Table 3.** Original [7] and modified compositions of the ESAW medium

Компонент	Запасной раствор (г·л ⁻¹ dH ₂ O)	Используемое количество для приготовления 1 л среды	
		оригинальный рецепт (30‰)	модифицированный рецепт (36‰)
Безводные соли		(г)	(г)
NaCl	–	21,194	24,490
Na ₂ SO ₄	–	3,550	4,102
KCl	–	0,599	0,692
NaHCO ₃	–	0,174	0,201
KBr	–	0,0863	0,100
H ₃ BO ₃	–	0,0230	0,027
NaF	–	0,0028	0,003
Гидратированные соли		(г)	(г)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	–	9,592	11,084
CaCl ₂ ·2H ₂ O	–	1,344	–
CaCl ₂ ·6H ₂ O	–	–	2,313
SrCl ₂ ·6H ₂ O	–	0,0218	0,025
Раствор тиосульфата натрия			
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	4,00	–	1,0 (мл)
Na ₂ CO ₃	0,02		
Главные биогенные элементы		(мл)	(мл)
NaNO ₃	46,67	1,0	0,75
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3,094	1,0	0,75
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	15,00	2,0	2,0
Раствор Fe-ЭДТА		(мл)	(мл)
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2,44	1,0	1,0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1,77		
Микроэлементы (из запасного раствора)	см. табл. 4	1,0	2,0
Витамины (из запасного раствора)	см. табл. 5	согласно рецепту	согласно рецепту

Примечание. dH₂O — дистиллированная вода; «—» — не используется

Note. dH₂O – distilled water; ‘—’ – not used

Таблица 4. Запасной раствор микроэлементов (см. табл. 3)**Table 4.** Stock solution of trace elements (see table 3)

Компонент	Запасной раствор (г·л ⁻¹ dH ₂ O)	Используемое количество	
		оригинальный рецепт	модифицированный рецепт
		(г)	(г)
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		3,09	3,09
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	–	0,073	0,073
CoSO ₄ ·7H ₂ O	–	0,016	0,016
MnSO ₄ ·4H ₂ O	–	0,54	0,54
		(мл)	(мл)
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,48	1	1
Na ₂ SeO ₃	0,173	1	1
NiCl ₂ ·6H ₂ O	1,49	1	1

Таблица 5. Запасной раствор витаминов (см. табл. 3)**Table 5.** Stock solution of vitamins (see table 3)

Компонент	Запасной раствор (г·л ⁻¹ dH ₂ O)	Используемое количество (мл)	
		оригинальный рецепт	модифицированный рецепт
Biotin (витамин Н)	–	0,1 (г)	–
Суанособаламин (витамин В ₁₂)	0,02	1	10
Thiamine · HCl (витамин В ₁)	0,5	2	10

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П., Паламарь-Мордвинцева Г. М., Ветрова З. И., Кордюм Е. Л., Мошкова Н. А., Приходькова Л. П., Коваленко О. В., Ступина В. В., Царенко П. М., Юнгер В. П., Радченко М. И., Виноградова О. Н., Бухтиярова Л. Н., Разумна Л. Ф. *Водоросли. Справочник*. Киев : Наукова думка, 1989. 608 с. [Vasser S. P., Kondrat'eva N. V., Masyuk N. P., Palamar'-Mordvintseva G. M., Vetrova Z. I., Kordyum E. L., Moshkova N. A., Prihod'kova L. P., Kovalenko O. V., Stupina V. V., Tsarenko P. M., Yunger V. P., Radchenko M. I., Vinogradova O. N., Buhtiyarova L. N., Razumna L. F. *Vodorosli. Spravochnik*. Kiev: Naukova dumka, 1989, 608 p. (in Russ.)].
2. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабилов Р. Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей: учебное пособие*. Уфа : Изд-во БГПУ, 2008. 152 с. [Gajgina L. A., Fazlutdinova A. I., Kabirov R. R. *Sovremennye metody vydeleniya i kul'tivirovaniya vodoroslej: uchebnoe posobie*. Ufa: Izd-vo BGPU, 2008, 152 p. (in Russ.)].
3. Давидович Н. А., Давидович О. И. Использование среды ESAW в опытах по изучению полового воспроизведения диатомовых водорослей // *Кардаг – 2009. Сборник трудов, посвященный 95-летию Карадагской научной станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины* / под ред. А. В. Гаевской, А. Л. Морозовой. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. С. 538–544. [Davidovich N. A., Davidovich O. I. Ispol'zovanie sredy ESAW v opytah po izucheniyu polovogo vosproizvedeniya diatomovyh vodoroslej. In: *Karadag – 2009. Sbornik trudov, posvyashchennyj 95-letiyu Karadagskoj nauchnoj stantsii i 30-letiyu Karadagского prirodnogo zapovednika letiyu Karadagского prirodnogo zapovednika Natsional'noj akademii nauk Ukrainy* / A. V. Gaevskaya, A. L. Morozova (Eds). Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2009, pp. 538–544. (in Russ.)].
4. Давидович Н. А., Давидович О. И., Подунай Ю. А. Коллекция культур диатомовых водорослей Карадагской научной станции (Крым) // *Морской биологический журнал*. 2017. Т. 2, № 1. С. 18–28. [Davidovich N. A., Davidovich O. I., Podunaj Yu. A. Diatom culture collection of the Karadag Scientific Station (Crimea). *Morskoj biologicheskij zhurnal*. 2017, vol. 2, no. 1, pp. 18–28. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2017.02.1.03>.
5. Рощин А. М. *Жизненные циклы диатомовых водорослей*. Киев : Наукова думка, 1994. 171 с. [Roshchin A. M. *Zhiznennye tsikly diatomovyh vodoroslej*. Kiev: Naukova dumka, 1994, 171 p. (in Russ.)].
6. Andersen R. A., Berges J. A., Harrison P. J., Watanabe M. M. Recipes for freshwater and seawater media. In: *Algal culturing techniques* / R. A. Andersen (Ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 429–538.
7. Andersen R. A., Kawachi M. Traditional microalgae isolation techniques. In: *Algal culturing techniques* / R. A. Andersen (Ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 83–100.
8. Famintzin A. Die anorganischen Salze als ausgezeichnetes Hilfsmittel zum Studium der Entwicklung niederer chlorophyllhaltiger Organismen. *Bulletin Academy of Sciences*. St. Petersburg, 1871, vol. 17, pp. 31–70.
9. Fortin C., Campbell P. G. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga:

- role of anion transporters in metal uptake. *Environmental Science & Technology*, 2001, vol. 35, iss. 11, pp. 2214–2218. <https://doi.org/10.1021/es0017965>.
10. Gagneux-Moreaux S., Moreau C., Gonzalez J.-L., Cosson R.P. Diatom artificial medium (DAM): a new artificial medium for the diatom *Haslea ostrearia* and other marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 2007, vol. 19, iss. 5, pp. 549–556. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9169-4>.
 11. Gaspar J. G. F. *Optimization of the composition and recycling strategy of the culture medium for industrial production of microalgae*. MS Degree Thesis. Lisboa: Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 2014, 92 p.
 12. Guillard R. R. L., Hallegraeff G. M., Anderson D. M., Cembella A. D. Culture methods. In: *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Paris: UNESCO, 1995, pp. 45–62. (IOC Manuals and Guides ; no. 33).
 13. Harrison P. J., Waters R. E., Taylor F. J. R. A broad spectrum artificial sea water medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology*, 1980, vol. 16, iss. 1, pp. 28–35. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x>.
 14. Harrison P. J., Berges J. A. Marine culture media. In: *Algal culturing techniques* / R. A. Andersen (Ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 21–34.
 15. Hiriart-Baer V. P., Fortin C., Lee D.-Y., Campbell P. G. C. Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: influence of thiosulphate. *Aquatic Toxicology*, 2006, vol. 78, iss. 2, pp. 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.027>.
 16. McLachlan J. Growth media – marine. In: *Handbook of phycological methods culture methods and growth measurements* / J. R. Stein (Ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1973, pp. 25–51.
 17. Preisig H. R., Andersen R. A. Historical review of algal culturing techniques. In: *Algal culturing techniques* / R. A. Andersen (Ed.). Burlington, MA: Elsevier Academic Press, 2005, pp. 1–12.
 18. Price N. M., Harrison G. I., Hering J. G., Hudson R. J., Nivel P. M. V., Palenik B., Morel F. M. M. Preparation and chemistry of the artificial algal culture medium Aquil. *Biological Oceanography*, 1988, vol. 6, pp. 443–461. <https://doi.org/10.1080/01965581.1988.10749544>.
 19. Provasoli L., McLaughlin J. J. A., Droop M. R. The development of artificial media for marine algae. *Archiv Für Mikrobiologie*, 1957, vol. 25, pp. 392–428. <https://doi.org/10.1007/BF00446694>.
 20. Ratte H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999, vol. 18, iss. 1, pp. 89–108. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180112>.

MODIFICATION OF THE ESAW CULTURE MEDIUM USED FOR CULTIVATION OF MARINE DIATOMS

S. L. Polyakova, O. I. Davidovich, Yu. A. Podunay, N. A. Davidovich

T. I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS, Feodosia, Russian Federation

E-mail: karadag-algae@yandex.ru

Experiments with clonal cultures of four pennate diatoms *Haslea karadagensis*, *H. ostrearia*, *Pleurosigma* sp. and *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata* revealed that adding of sodium thiosulfate to the culture medium resulted in increase of algae growth rate. The highest, approximately two-fold, increase of the growth rate was observed in *Pseudo-nitzschia* cf. *seriata*, a member of the genus including toxicogenous species. Dependence of the algae growth rate on concentration of sodium thiosulfate was studied; optimal concentrations providing the highest growth rate were determined. Addition of ferrous-ammonium citrate or replacement of ferric chloride with ferrous-ammonium citrate did not affect the growth rate of the diatoms studied. For practical reasons, it is useful to prepare culture medium with the salinity of 36‰. Modified recipe of the ESAW medium is given.

Keywords: diatom algae, cultivation, artificial media, sodium thiosulfate