

УДК 582.261.1:577.1.044

ВЛИЯНИЕ АЗОТА И ФОСФОРА НА НАКОПЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАРЕННИН-ПОДОБНОГО ПИГМЕНТА В КУЛЬТУРЕ *HASLEA KARADAGENSIS* (BACILLARIOPHYTA)

© 2025 г. Е. С. Кириенко, Н. А. Давидович

Карадагская научная станция имени Т. И. Вяземского — природный заповедник РАН —
филиал ФИЦ ИнБИОМ, Феодосия, Российская Федерация
E-mail: esk-00@bk.ru

Поступила в редакцию 15.01.2025; после доработки 15.01.2025;
принята к публикации 12.08.2025.

В настоящее время известно пять видов диатомовых водорослей из рода *Haslea*, которые способны продуцировать пигменты мареннины, слегка различающиеся по своим физико-химическим характеристикам. Имеющиеся сведения относятся главным образом к мареннину *H. ostrearia*. Это делает актуальным изучение мареннин-подобных пигментов у других представителей рода, в частности у *H. karadagensis* — эндемика Чёрного моря. Цель исследования заключалась в анализе влияния азота и фосфора на накопление внеклеточного мареннин-подобного пигмента в клонных культурах *H. karadagensis*. Следует отметить противоречивость литературных данных о влиянии этих основных биогенных элементов на накопление мареннина в культурах. Для изученных клонов *H. karadagensis* установлено отсутствие значимой корреляции между удельной продуктивностью клеток в отношении выделения внеклеточного мареннин-подобного пигмента и уровнями азота и фосфора в среде. Определены темпы роста численности клеток и динамика накопления внеклеточного пигмента в культурах *H. karadagensis*.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, *Haslea karadagensis*, мареннин, биогенные элементы, накопление пигмента, удельная продуктивность, численность клеток

Мареннин — водорастворимый пигмент, продуцируемый некоторыми диатомовыми водорослями рода *Haslea*. Пигменты группы мареннинов имеют голубой, сине-зелёный или серо-зелёный цвет в зависимости от видовой принадлежности продуцента, обладают антибактериальной, противовирусной, антипролиферативной [Bergé et al., 1999; Carbonnelle et al., 1999; Gastineau et al., 2012b, c] и антиоксидантной активностью [Pouvreau et al., 2008] и проявляют аллелопатию в отношении бактерий, некоторых микроводорослей и беспозвоночных [Pouvreau et al., 2007; Prasetya et al., 2016, 2020].

Несмотря на практический интерес к использованию мареннинов в аквакультуре устриц на Атлантическом побережье Франции [Gastineau et al., 2012c, 2018] и на более чем 100-летнюю историю их изучения, функциональное назначение, структура молекулы и разнообразие этой группы пигментов остаются нераскрытыми. Считается, что пигмент способен экранировать излишки фотосинтетически активной радиации, выступая таким образом в роли фотопротектора [Schubert et al., 1995]. Известно, что мареннин имеет 2 формы, отличные между собой по химическому составу и спектральным характеристикам [Pouvreau et al., 2006]. Внутриклеточная форма пигмента накапливается в апикальных областях клеток. Высвободившаяся из клетки в окружающую среду внеклеточная форма мареннина имеет несколько иные физико-химические свойства

и меньшую молекулярную массу. Долгое время считалось, что единственным видом, способным продуцировать мареннин, является *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen. Описание в 2012 г. второго мареннинпродуцирующего вида — *H. karadagensis* Davidovich, Gastineau & Mouget [Gastineau et al., 2012a], обнаруженного в прибрежной части Чёрного моря, — положило начало изучению разнообразия мареннинов [Gastineau et al., 2014].

По мнению D. Neuville и P. Daste [1972; 1978], высвобождение мареннина *H. ostrearia* вызвано неблагоприятными условиями окружающей среды, в особенности нитратным голоданием при наличии света. Аналогичного мнения придерживается T. Lebeau [Lebeau et al., 2000], утверждая, что при недостаточном количестве азота происходит стрессирование клеток, вызывающее усиленный синтез пигмента. R. Nghiem Xuan [Nghiem Xuan et al., 2021] подтверждает, что именно ограничение, а не дефицит кремния и азота является причиной высокой концентрации внеклеточного мареннина, зарегистрированной в культурах *H. ostrearia*. Некоторые авторы объясняют увеличение содержания внеклеточного мареннина в культуре лизисом клеток при достижении ими значительной численности и при дефиците питательных веществ [Nghiem Xuan et al., 2020], не придавая внимания существованию двух различных форм пигмента. Иного мнения придерживаются авторы, которые утверждают, что основным фактором, влияющим на высвобождение мареннина, является количество и спектральный состав света [Mouget et al., 1999, 2004, 2005; Prasetya et al., 2016]. Было зафиксировано увеличение продукции мареннина при уменьшении размеров клеток *H. ostrearia* на протяжении жизненного цикла [Pedron et al., 2023]. На данный момент известно пять видов, способных продуцировать мареннин-подобные пигменты. Помимо вышеназванных, к ним относятся *H. provincialis* Gastineau, Hansen & Mouget [Gastineau et al., 2016], *H. nusantara* Mouget, Gastineau & Syakti [Prasetya et al., 2019] и *H. silbo* Gastineau, Hansen & Mouget [Gastineau et al., 2021]. Мареннин-подобные пигменты (далее — мареннины) демонстрируют некоторое различие физико-химических характеристик [Gastineau et al., 2014; Pouvreau et al., 2006]. Разнообразие пигментов обусловило цель настоящей работы, которая заключалась в определении влияния концентраций азота и фосфора на эффективность продукции мареннина и на изменение численности клеток в культуре диатомовой водоросли *Haslea karadagensis*, ранее в этом отношении не изучавшейся.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте с добавлением биогенных элементов было использовано три клона морской диатомовой водоросли *H. karadagensis*, 23.1113-KS, 23.1129-KE и 23.1227-KC, которые являются потомками родительских пар 22.1128-KC + 23.1129-KU, 22.1129-КА + 22.1129-KВ и 22.1228-KE + 22.1128-КН соответственно, взятых из Коллекции диатомовых водорослей Мирового океана (Карадагская научная станция, ФИЦ ИнБЮМ, <https://ibss-ras.ru/about-ibss/structure-ibss/tentry-kollektivnogo-polzovaniya/collection-of-diatoms-of-world-ocean/>). Клоны 23.1129-KE и 23.1113-KS демонстрировали большую концентрацию внеклеточного мареннина и численность клеток, а клон 23.1227-KC был менее продуктивным. В среднем размеры клеток для клонов 23.1129-KE, 23.1113-KS и 23.1227-KC составляли $(15,3 \pm 0,28)$, $(48,5 \pm 0,32)$ и $(56,1 \pm 0,28)$ мкм соответственно.

Альгологически чистые культуры содержали в неаксеничных условиях в стеклянных колбах Эрленмейера объёмом 50 мл. В качестве среды использовали модифицированную искусственную среду ESAW (Enriched Seawater, Artificial Water) [Полякова и др., 2018] с уровнем солёности 20 ‰, которая была принята за стандартные условия культивирования. Культуры выращивали при температуре +20 °C при двух уровнях освещённости, 3,3 и 7,2 клк, с применением светодиодных ламп LLED-05-T5-FITO-14W-W [ATL Business (Shenzhen) Co., Ltd., Китай]. Фотопериод свет : темнота — 14 ч : 10 ч. Освещённость измеряли с помощью люксметра Ю-116 (СССР). В колбы добавляли 0,5 мл инокулята с плотностью клеток 100 кл.·мл⁻¹.

У шести клонов *H. karadagensis* в течение 20 дней с интервалом в 2 дня измеряли концентрацию пигмента, выделившегося в среду. Концентрацию клеток определяли при помощи камеры Фукса — Розенталя. По изменению численности установлен темп деления клеток для первых 5 дней согласно экспоненциальной модели роста [Wood et al., 2005]. Аналогичным образом рассчитана скорость накопления мареннина в культурах для этих же клонов.

В ходе исследования испытано 24 различных варианта концентрации азота и 29 вариантов концентрации фосфора в 154 сочетаниях. Для двух клонов при более высокой освещённости (7,2 клк) испытано 12 комбинаций с использованием азота и фосфора.

Предварительно из состава полностью искусственной среды ESAW исключали основные биогенные элементы (азот и фосфор); затем вносили их необходимое количество в виде соединений NaNO_3 и NaH_2PO_4 . Концентрацию элементов в составе среды задавали в диапазоне от 0,136 до 43,2 мг·л⁻¹ для азота и от 0,014 до 4,481 мг·л⁻¹ для фосфора. В качестве контроля выступала модифицированная среда ESAW.

Длительность нарастания культур в экспериментах составляла 10 дней, в течение которых они находились в экспоненциальной фазе роста, не достигая стационарной. При этом высвобождение клетками внеклеточного мареннина в культуральную среду было прижизненным, о чём свидетельствовало отсутствие мёртвых клеток (пустых панцирей). В 10-дневный срок в культурах накапливался внеклеточный мареннин в концентрации, достаточной для спектрофотометрического анализа.

Неспецифическое поглощение оказалось крайне низким, что позволяло использовать для спектрального анализа непрофильтрованную среду, содержащую растворённый внеклеточный мареннин. Оптическую плотность измеряли в кювете с длиной оптического пути 2 см. Спектры поглощения регистрировали с использованием спектрофотометра ПромЭкоЛаб ПЭ-5400УФ (Shanghai Mapada Instruments Co., Ltd., Китай) и прилагаемого программного обеспечения Scan54.

Для расчёта по закону Бугера — Ламберта — Бера концентрации внеклеточного мареннина *H. karadagensis* мы применяли единственные известные на данный момент значения молярного коэффициента экстинкции [$\epsilon_{677} = 120\,000$ л·моль⁻¹·см⁻¹ для длины волны 677 нм] и молярной массы [$M = (9893 \pm 1)$ Да], полученные для внеклеточного мареннина *H. ostrearia* [Pouvreau et al., 2006]. Длина волны 677 нм соответствует максимальной оптической плотности в красной области спектра для внеклеточных форм мареннина обоих видов. Концентрацию клеток в культурах подсчитывали на 10-й день эксперимента.

Средние значения концентрации внеклеточного мареннина, численности клеток и удельной продуктивности клеток в отношении внеклеточного мареннина (далее — удельная продуктивность) в тексте и на рисунках приведены с учётом ошибки среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В принятых нами стандартных условиях культивирования наблюдался экспоненциальный рост численности клеток *H. karadagensis* в течение как минимум 5–6 дней (рис. 1А). Это согласуется с данными авторов, у которых при различных концентрациях биогенов поздняя экспоненциальная фаза наступала на 8-й день культивирования [Pedron et al., 2023]. В дальнейшем происходило затухание роста, клетки образовывали скопления, в связи с чем их точный подсчёт в последующие дни был невозможен.

Концентрация мареннина в культуре на протяжении первой недели также возрастала экспоненциально, а в последующем в течение месяца — линейно (рис. 1В). График скорости накопления внеклеточного мареннина демонстрирует: для получения концентрации пигмента, достаточной для спектрофотометрического анализа, необходимо 5–8 дней, на протяжении

которых культура *H. karadagensis* находится в экспоненциальной фазе роста, клетки не погибают и в среде накапливается исключительно внеклеточная форма пигмента. К концу месяца стала заметной вариабельность клонов по численности клеток и содержанию внеклеточного мареннина.

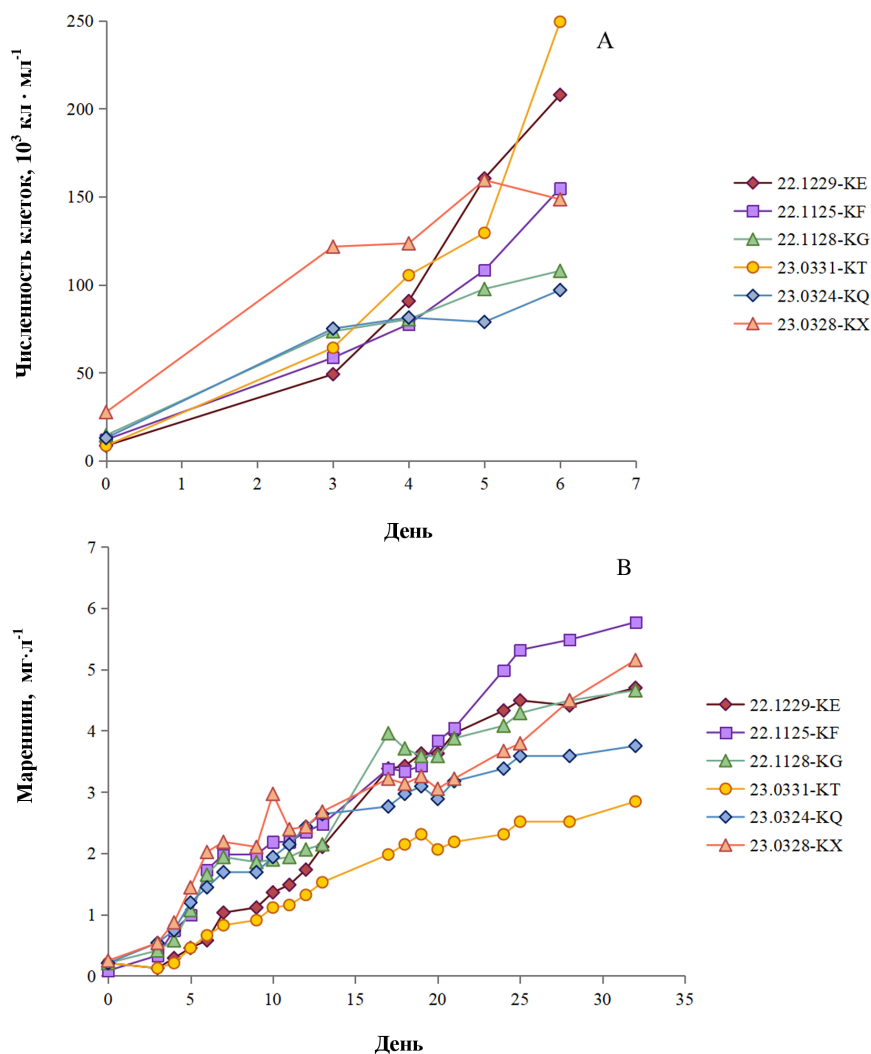


Рис. 1. Рост численности клеток (А) и накопление внеклеточного мареннина (В) в культурах *Haslea karadagensis* при стандартных условиях культивирования. В легенде указаны названия использованных клонов

Fig. 1. The cell density growth (A) and extracellular marennine accumulation (B) in *Haslea karadagensis* cultures under standard cultivation conditions. The legend indicates the names of the clones used

При повышении концентрации азота и фосфора отмечено уменьшение содержания внеклеточного мареннина, накапливающегося в среде. Эта зависимость с высокой корреляцией аппроксимируется экспоненциальной функцией (рис. 2А, В). При этом при увеличении концентрации азота численность клеток, достигаемая в культурах, заметно снижалась (рис. 2С), в то время как повышение содержания фосфора в среде в изученном диапазоне не приводило к падению численности клеток (рис. 2D). Наши данные вполне согласуются с наблюдениями других авторов, проведёнными с использованием культур *H. ostrearia* [Lebeau et al., 2000; Neuville, Daste, 1972, 1978; Nghiem Xuan et al., 2021].

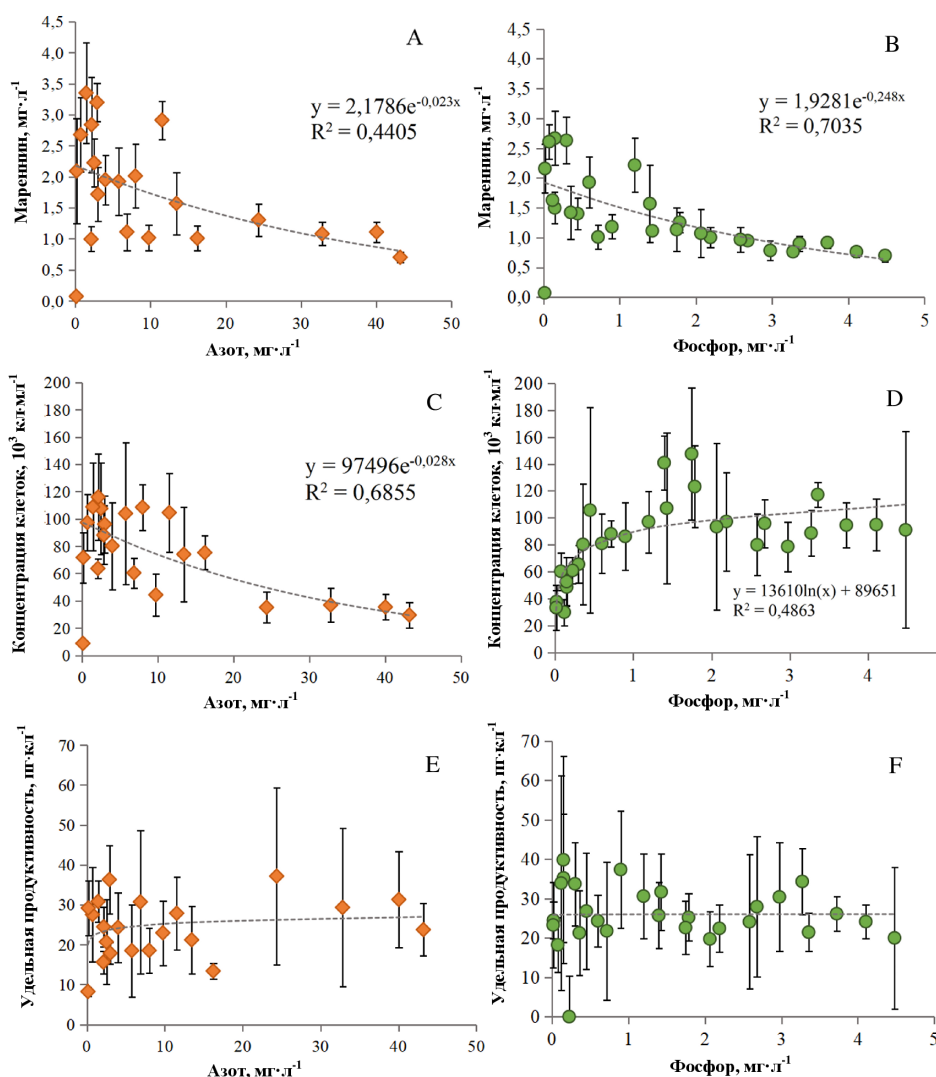


Рис. 2. Средние значения содержания внеклеточного мареннина (А, В), численности клеток (С, D) и удельной продуктивности клеток в отношении внеклеточного мареннина (Е, F) в культуре *Haslea karadagensis* для разных значений азота и фосфора в среде при уровне освещённости 3,3 клк. При аппроксимации данных исключены значения концентрации биогенов, близкие к нулю (0,136 мг·л⁻¹ для азота и 0,014 мг·л⁻¹ для фосфора)

Fig. 2. The mean values of extracellular marennine content (A, B), cell density (C, D), and specific extracellular marennine productivity (E, F) in *Haslea karadagensis* culture for different concentration of nitrogen and phosphorus in the medium at the illuminance level of 3.3 klx. When approximating the data, concentrations of biogenic elements close to zero were excluded (0.136 µg·L⁻¹ for nitrogen and 0.014 µg·L⁻¹ for phosphorus)

В культурах клонов 23.1129-KE и 23.1113-KS, которые демонстрировали наибольшую продуктивность, накапливалось в среднем 1,8 мг·л⁻¹ мареннина при концентрации азота 0,177–43,200 мг·л⁻¹ и фосфора 0,018–4,784 мг·л⁻¹ и при освещённости 3,3 клк. Средняя численность клеток и удельная продуктивность — 77 197 кл·мл⁻¹ и 30 пг·кл⁻¹ соответственно.

Клон 23.1227-KC оказался менее продуктивным: средняя концентрация мареннина составила 1,25 мг·л⁻¹. В экспериментах с этим клоном была испытана максимальная концентрация азота (128,5 мг·л⁻¹), что, впрочем, не привело к заметному изменению концентрации мареннина. Гибель клеток вследствие отравления азотом не наблюдали.

Для освещённости 7,2 клк среднее значение содержания внеклеточного мареннина было равно $3,14 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Численность клеток составляла $58\,177 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$, а удельная продуктивность — $60 \text{ пг} \cdot \text{кл}^{-1}$, что вдвое выше, чем при меньшей освещённости.

При близких к нулю концентрациях биогенных элементов — $0,136 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ для азота и $0,014 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ для фосфора — продукция мареннина была минимальной и составляла в среднем $0,51 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Однако даже незначительное увеличение их содержания — азота до $0,177 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ и фосфора до $0,018 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ — приводило к достижению такой же концентрации клеток и мареннина в среде, что и при большей обеспеченности биогенными элементами (рис. 3).

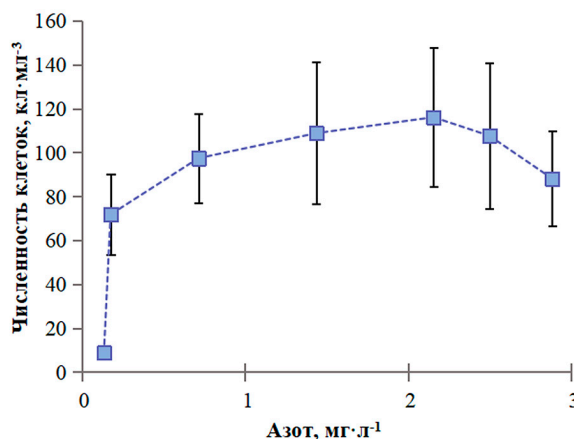


Рис. 3. Численность клеток, достигаемая в культуре *Haslea karadagensis* на 10-й день культивирования при низких значениях концентрации азота

Fig. 3. The cell density in the *Haslea karadagensis* culture after 10 days of cultivation under low nitrogen concentration

По полученным данным, удельная продуктивность клеток культур *H. karadagensis* по мареннину (внеклеточная форма) не зависела от концентрации основных биогенных элементов в довольно широком диапазоне, за исключением минимальных значений, и составляла в среднем около $30 \text{ пг} \cdot \text{кл}^{-1}$ (рис. 2Е, F).

Предполагается, что основным фактором, лимитирующим продукцию пигмента, является освещённость, поскольку мареннин, как считают, выполняет фотопротекторную функцию, защищая хлоропласты от ультрафиолетового излучения [Schubert et al., 1995]. Как ранее упоминалось, спектральный состав света оказывает некоторое воздействие на накопление пигмента: продукция мареннина заметно возрастала при освещении культур *H. ostrearia* синим светом по сравнению с таковой при освещении контрольным белым [Mouget et al., 2005].

Численность клеток диатомовых водорослей, по мнению некоторых авторов, определяется главным образом доступностью кремния [Nghiem Xuan et al., 2021]. Вторым важным элементом, оказывающим влияние на рост численности клеток, является фосфор [Turpin et al., 1999]. В используемой нами среде ESAW концентрация кремния составляет $3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, чего вполне достаточно для потребления клетками в течение 10 дней культивирования.

Показано [Nghiem Xuan et al., 2020], что накопление мареннина в среде в значительной мере зависит от её состава. Также отмечено: если в состав среды одновременно входят органические и неорганические источники азота и фосфора, то продукция мареннина оказывается низкой. При этом, как и в наших экспериментах, увеличение концентрации азота до определённых значений сначала благоприятствовало синтезу мареннина, а в последующем тормозило рост численности клеток и накопление пигмента в среде. Наиболее приближенной по составу к ESAW является

среда ASW (Artificial Seawater). Согласно приведённым данным [Nghiem Xuan et al., 2020], оптимальной для накопления мареннина оказалась среда, разработанная на основе среды ES1/3. При этом не только состав играл существенную роль в синтезе мареннина, но и концентрация биогенных элементов.

Помимо общетеоретической ценности, полученные результаты имеют практическое значение для области биотехнологии, в частности для аквакультуры моллюсков-фильтраторов, таких как устрицы. Мареннин не только улучшает их органолептические свойства и повышает коммерческую стоимость, но и, являясь биологически активным веществом, оказывает профилактическое действие — предохраняет от болезней [Gastineau et al., 2012c, 2018]. В настоящее время биотехнология производства мареннина с использованием культур представителей рода *Haslea* не применяется; фермеры, выращивающие устриц, довольствуются естественными и слабо предсказуемыми всплесками развития водорослей в прудах, в которых осуществляется передержка этих моллюсков. Отметим, что в природных условиях не достигается такая же высокая концентрация мареннина, как в лабораторных культурах. Так, в одном из натурных экспериментов с обогащением азотом, фосфором и кремнием воды, подаваемой в устричные пруды, максимальное зарегистрированное содержание внеклеточного мареннина составляло $2,7 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ [Turpin et al., 1999]; во внелабораторном эксперименте концентрация мареннина достигала $3,4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ [Turpin et al., 2001]. В культуре *H. ostrearia*, содержащейся в фотобиореакторе, содержание мареннина было на порядок большим — $20\text{--}30 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ [Rossignol et al., 2000].

Ещё один фактор, на который следует обратить внимание, — клоновая вариабельность. В нашем исследовании использованы три клона *H. karadagensis*; два из них демонстрировали более высокую продуктивность в отношении синтеза внеклеточного мареннина. Аналогичную картину варьирования наблюдали в экспериментах с *H. ostrearia* [Mouget et al., 2005; Pedron et al., 2023]. При этом клоны различались размерами клеток, что указывает на их нахождение на разных стадиях жизненного цикла. Наибольшей продуктивностью в отношении накопления пигмента характеризовались клетки средних размеров. Точные причины вариабельности неизвестны, и это может стать темой новых исследований.

Заключение. Для мареннинпродуцирующей диатомовой водоросли *Haslea karadagensis* не наблюдали значимой корреляции между содержанием азота и фосфора в среде и удельной продуктивностью в отношении синтеза внеклеточного мареннина. Для оптимального роста культур *H. karadagensis* и накопления в среде внеклеточного пигмента достаточно относительно небольших концентраций основных биогенных элементов — $0,177 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ азота и $0,018 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ фосфора. Увеличение их содержания оказывает отрицательное воздействие на рост численности клеток и на накопление внеклеточного мареннина в культуре.

Ключевыми факторами, определяющими продуктивность накопления мареннина, выступили интенсивность освещения и, вероятно, клоновая вариабельность. Повышение освещённости с 3,3 до 7,2 клк стимулировало почти двукратный рост как концентрации внеклеточного пигмента, так и удельной продуктивности. Влияние внутрикловых различий требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00054).

В работе использованы материалы научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ «Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Полякова С. Л., Давидович О. И., Подунай Ю. А., Давидович Н. А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3, № 2. С. 73–80. [Polyakova S. L., Davidovich O. I., Podunay Yu. A., Davidovich N. A. Modification of the ESAW culture medium used for cultivation of marine diatoms. *Marine Biological Journal*, 2018, vol. 3, no. 2, pp. 73–80. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2018.03.2.06>
2. Bergé J.-P., Bourgougnon N., Alban S., Poger F., Billaudel S., Chermann J.-C., Robert J.-M., Franz G. Antiviral and anticoagulant activities of a water-soluble fraction of the marine diatom *Haslea ostrearia*. *Planta Medica*, 1999, vol. 65, iss. 7, pp. 604–609. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14032>
3. Carbonnelle D., Pondaven P., Morançais M., Massé G., Bosch S., Jacquot C., Briand G., Robert J.-M., Roussakis C. Antitumor and anti-proliferative effects of an aqueous extract from the marine diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon) Simonsen against solid tumors: Lung carcinoma (NSCLC-N6), kidney carcinoma (E39) and melanoma (M96) cell lines. *Anticancer Research*, 1999, vol. 19, iss. 1A, pp. 621–624.
4. Gastineau R., Davidovich N. A., Bardeau J.-F., Caruso A., Leignel V., Hardivillier Y., Jacquette B., Davidovich O. I., Rincé Y., Gaudin P., Cox E. J., Mouget J.-L. *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta): A second blue diatom, recorded from the Black Sea and producing a novel blue pigment. *European Journal of Phycology*, 2012a, vol. 47, iss. 4, pp. 469–479. <https://doi.org/10.1080/09670262.2012.741713>
5. Gastineau R., Davidovich N., Hansen G., Rines J., Wulff A., Kaczmariska I., Ehrman J., Hermann D., Maumus F., Hardivillier Y., Leignel V., Jacquette B., Méléder V., Hallegraeff G., Yallop M., Perkins R., Cadoret J.-P., Saint-Jean B., Carrier G., Mouget J.-L. *Haslea ostrearia*-like diatoms: Biodiversity out of the blue. In: *Advances in Botanical Research*. Vol. 71. *Sea Plants* / N. Bourgougnon (Ed.). UK : Academic Press, 2014, pp. 441–465. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408062-1.00015-9>
6. Gastineau R., Hansen G., Davidovich N. A., Davidovich O. I., Bardeau J.-F., Kaczmariska I., Ehrman J. M., Leignel V., Hardivillier Y., Jacquette B., Poulin M., Morançais M., Fleurence J., Mouget J.-L. A new blue-pigmented hasleoid diatom, *Haslea provincialis*, from the Mediterranean Sea. *European Journal of Phycology*, 2016, vol. 51, iss. 2, pp. 156–170. <https://doi.org/10.1080/09670262.2015.1110861>
7. Gastineau R., Hansen G., Poulin M., Lemieux C., Turmel M., Bardeau J.-F., Leignel V., Hardivillier Y., Morançais M., Fleurence J., Gaudin P., Méléder V., Cox E. J., Davidovich N. A., Davidovich O. I., Witkowski A., Kaczmariska I., Ehrman J. M., Onís E. S., Quintana A. M., Mucko M., Mordret S., Sarno D., Jacquette B., Falaise C., Séveno J., Lindquist N. L., Kemp P. S. Jr., Eker-Develi E., Konucu M., Mouget J.-L. *Haslea silbo*, a novel cosmopolitan species of blue diatoms. *Biology*, 2021, vol. 10, iss. 4, art. no. 328 (27 p.). <https://doi.org/10.3390/biology10040328>
8. Gastineau R., Hardivillier Y., Leignel V., Tekaya N., Morançais M., Fleurence J., Davidovich N. A., Jacquette B., Gaudin P., Hellio C., Bourgougnon N., Mouget J.-L. Greening effect on oysters and biological activities of the blue pigments produced by the diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquaculture*, 2012b, vol. 368–369, pp. 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.016>
9. Gastineau R., Pouvreau J.-B., Hellio C., Morançais M., Fleurence J., Gaudin P., Bourgougnon N., Mouget J.-L. Biological activities of purified marennine, the blue pigment produced by the diatom *Haslea ostrearia* and responsible for the greening of oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012c, vol. 60, iss. 14, pp. 3599–3605. <https://doi.org/10.1021/jf205004x>
10. Gastineau R., Prasetya F. S., Falaise C., Cognie B., Decottignies P., Morançais M., Méléder V., Davidovich N. A., Turcotte F., Tremblay R., Pasetto P., Dittmer J., Bardeau J.-F., Pouvreau J.-B., Mouget J.-L. Marennine-like pigments: Blue diatom or green oyster cult? In: *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules* : in 2 vols / S. La Barre, S. S. Bates (Eds). Weinheim : Wiley-VCH Verlag

- GmbH & Co. KGaA, 2018, vol. 2, pp. 529–551. <https://doi.org/10.1002/9783527801718.ch16>
11. Lebeau T., Gaudin P., Junter G.-A., Mignot L., Robert J.-M. Continuous marennine production by agar-entrapped *Haslea ostrearia* using a tubular photobioreactor with internal illumination. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, vol. 54, iss. 5, pp. 634–640. <https://doi.org/10.1007/s002530000380>
 12. Mouget J.-L., Rosa P., Tremblin G. Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities – confirmation of ‘chromatic adaptation’ in diatoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2004, vol. 75, iss. 1–2, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2004.04.002>
 13. Mouget J.-L., Rosa P., Vachoux C., Tremblin G. Enhancement of marennine production by blue light in the diatom *Haslea ostrearia*. *Journal of Applied Phycology*, 2005, vol. 17, iss. 5, pp. 437–445. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-0561-7>
 14. Mouget J.-L., Tremblin G., Morant-Marceau A., Morançais M., Robert J.-M. Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): Effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *European Journal of Phycology*, 1999, vol. 34, iss. 2, pp. 109–115. <https://doi.org/10.1080/09670269910001736162>
 15. Neuville D., Daste P. H. Production du pigment bleu par la diatomée *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory, maintenue en culture uni-algue sur milieu synthétique carencé en azote. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences. Sér. D Sciences Naturelles*, 1972, vol. 274, pp. 2030–2033.
 16. Neuville D., Daste P. H. Recherches sur le déterminisme de la production de marennine par la diatomée marine *Navicula ostrearia* (Gaillon) Bory en culture *in vitro*. *Revue générale de botanique*, 1978, vol. 85, pp. 255–303.
 17. Nghiem Xuan R., Mouget J.-L., Turpin V., Jaouen P., Pruvost J. Optimization of the growth and marennine production by the diatom *Haslea ostrearia* in photobioreactor. *Algal Research*, 2021, vol. 55, art. no. 102251 (17 p.). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102251>
 18. Nghiem Xuan R., Safitri I., Mouget J.-L., Pruvost J., Turpin V., Jaouen P. Design of an artificial culture medium to optimize *Haslea ostrearia* biomass and marennine production. *Algal Research*, 2020, vol. 45, art. no. 101653 (11 p.). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101653>
 19. Pedron E., Gargouch N., Mouget J.-L., Tremblay R., Deschênes J.-S., Massé A., Gonçalves O. Hybrid photobioreactor operation for the intensified production of *Haslea ostrearia* and marennine in function of strain variability. *Algal Research*, 2023, vol. 75, art. no. 103285 (9 p.). <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103285>
 20. Pouvreau J.-B., Housson E., Le Tallec L., Morançais M., Rincé Y., Fleurence J., Pondaven P. Growth inhibition of several marine diatom species induced by the shading effect and allelopathic activity of marennine, a blue-green polyphenolic pigment of the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2007, vol. 352, iss. 1, pp. 212–225. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.07.011>
 21. Pouvreau J.-B., Morançais M., Fleury F., Rosa F., Thion L., Cahingt B., Zal F., Fleurence J., Pondaven P. Preliminary characterization of the blue-green pigment “marennine” from the marine tychopelagic diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology*, 2006, vol. 18, iss. 6, pp. 757–767. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9087-x>
 22. Pouvreau J.-B., Morançais M., Taran F., Rosa P., Dufossé L., Guérard F., Pin S., Fleurence J., Pondaven P. Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, vol. 56, iss. 15, pp. 6278–6286. <https://doi.org/10.1021/jf073187n>
 23. Prasetya F. S., Decottignies P., Tremblay R., Mouget J.-L., Sunarto S., Iskandar I., Dhahiyat Y., Cognie B. Not only greening: The effects of marennine produced by *Haslea ostrearia* on physiological traits of three bivalve species. *Aquaculture Reports*, 2020, vol. 18, art. no. 100546 (8 p.). <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100546>
 24. Prasetya F. S., Gastineau R., Poulin M., Lemieux C., Turmel M., Syakti A. D., Hardivillier Y., Widowati I., Risjani Y., Iskandar I., Subroto T., Falaise C., Arsad S., Safitri I., Mouget J.-L., Leignel V. *Haslea nusantara* (Bacillariophyceae), a new blue diatom from the Java Sea, Indonesia: Morphology, biometry and molecular characterization. *Plant Ecology*

- and Evolution, 2019, iss. 152, no. 2, pp. 188–202. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2019.1623>
25. Prasetya F. S., Safitri I., Widowati I., Cogie B., Decottignies P., Gastineau R., Morangais M., Windarto E., Tremblay R., Mouget J.-L. Does allelopathy affect co-culturing *Haslea ostrearia* with other microalgae relevant to aquaculture? *Journal of Applied Phycology*, 2016, vol. 28, iss. 4, pp. 2241–2254. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0779-y>
 26. Rossignol N., Jaouen P., Robert J.-M., Quéméneur F. Production of exocellular pigment by the marine diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in a photobioreactor equipped with immersed ultrafiltration membranes. *Biore-source Technology*, 2000, vol. 73, iss. 2, pp. 197–200. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00171-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00171-6)
 27. Schubert H., Tremblin G., Robert J.-M., Saget S., Rincé Y. *In-vivo* fluorescence measurement of photosynthesis of *Haslea ostrearia* Simonsen in relation to marennine content. *Diatom Research*, 1995, vol. 10, iss. 2, pp. 341–349. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1995.9705354>
 28. Turpin V., Robert J.-M., Goulletquer P. Limiting nutrients of oyster pond seawaters in the Marennes-Oléron region for *Haslea ostrearia*: Applications to the mass production of the diatom in mesocosm experiments. *Aquatic Living Resources*, 1999, vol. 12, iss. 5, pp. 335–342. [https://doi.org/10.1016/S0990-7440\(99\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0990-7440(99)00114-X)
 29. Turpin V., Robert J.-M., Goulletquer P., Massé G., Rosa P. Oyster greening by outdoor mass culture of the diatom *Haslea ostrearia* Simonsen in enriched seawater. *Aquaculture Research*, 2001, vol. 32, iss. 10, pp. 801–809. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2001.00615.x>
 30. Wood A. M., Everroad R. C., Wingard L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: *Algal Culturing Techniques* / R. A. Andersen (Ed.). New York : Elsevier Academic Press, 2005, pp. 269–286. <https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50019-6>

THE EFFECT OF NITROGEN AND PHOSPHORUS ON THE ACCUMULATION OF EXTRACELLULAR MARENnine-LIKE PIGMENT IN THE CULTURE OF *HASLEA KARADAGENSIS* (BACILLARIOPHYTA)

E. Kirienko and N. Davidovich

T. I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of RAS – Branch of IBSS,
Feodosiya, Russian Federation
E-mail: esk-00@bk.ru

Currently, five diatom species from the genus *Haslea* are known to produce marennine pigments which slightly differ in their physicochemical characteristics. The available data on these pigments primarily relate to *H. ostrearia*, but given the biodiversity noted, it is important to analyze the pigments in other representatives of the genus, specifically *H. karadagensis*, endemic to the Black Sea. The aim of this study was to investigate the effect of nitrogen and phosphorus on the accumulation of marennine-like pigments in *H. karadagensis* cultures. Literature data on the effects of these essential biogenic elements on pigment accumulation in the cultures are conflicting. For the clones analyzed, the absence of a significant correlation was established between the specific productivity in relation to the release of extracellular marennine and levels of nitrogen and phosphorus in a medium. Growth rates and dynamics of extracellular marennine accumulation in *H. karadagensis* cultures are determined.

Keywords: diatoms, *Haslea karadagensis*, marennine, biogenic elements, pigment accumulation, specific productivity, cell abundance