

UDC 582.261 : 581.143 = 20

STUDIJA RASTA MORSKE DIJATOMEJE  
*PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*  
U MONOKULTURI

With Summary in English

NEDA FANUKO

(Morski raziskovalni in izobraževalni center Piran, Institut za biologijo Univerze  
Edvarda Kardelja v Ljubljani)

Priljeno 10. 10. 1980.

## Uvod

Dijatomeja *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin 1897 spada u red onih morskih fitoplanktonskih alga koje se zbog svoje eurivalentnosti (Ukles 1976), brzog rasta (Ansell et al. 1963 a), efikasnog iskorištenja svjetlosne energije u fotosintetskim procesima (Ansell et al. 1963 b) i hranjivosti (Raymont et Adams 1958) često koriste u pokusima laboratorijskih (Lewin et al. 1958, Canzonier et Brunetti 1975, Nelson et al. 1979), kao i masovnih kultura uzgojenih u velikim rezervoarima u prirodnoj morskoj sredini (Raymont et Adams 1958, Ansell et al. 1963 a, b).

Otprije poznata kao *Nitzschia closterium* W. Sm. forma *minutissima*, ta vrsta uvrštena je u novi podred *Phaeodactylinae* s jednim poznatim rodom: *Phaeodactylum* (Lewin 1958). Rasprostranjena je u brakičnim vodama neritskih područja Atlantskog oceana (Hendey 1964). Opisana je za sjeverni Jadran (Keržan et Stirn 1976) i za sjevernojadranske lagune u Strunjanu, gdje se javlja samo iznimno (Fanuko 1980). Smatraju je relativno rijetkom komponentom većine prirodnih morskih fitoplanktonskih zajednica (Nelson et al. 1979).

U ovom radu opisan je rast alge *P. tricornutum* u laboratorijskim uvjetima s obzirom na različite faktore: vrstu medija (korištena je sintetska morska voda i pučinska voda sjevernog Jadrana), djelovanje slanosti (alga je uspješno uzgojena u mediju saliniteta 2‰, a preživjela je do kraja pokusa u mediju sa slanošću 0‰, dakle u slatkoj vodi), nadalje djelovanje temperature i hranidbenih soli, te utjecaj vitamina na proizvodnju stanica.

## Materijal i metode

Monokultura alge *P. tricorutum* (Ab. 3—5) dobivena je od Provasolijevog instituta u New Yorku, gdje je izolirana iz prirodne morske sredine (sl. 1).

Pri proučavanju učinka vitamina i hranidbenih soli iskorištena je za rast alge sintetska morska voda po ZoBell-u (ZoBell 1946), a za ostale pokuse pučinska morska voda sjevernog Jadrana, procijeđena kroz Millipore filtre s promjerom pora 0.45  $\mu\text{m}$ , te po potrebi obogaćena standardnom 2‰-tnom hranidbenom otopinom Provasoli ES (Pinceman 1971). U pripremljene medije volumena 80 ml cijepljeno je po 0.3 ml kulture alge u logaritamskoj fazi, što je dalo početnu koncentraciju od približno  $10^5$  jedinki/ml u proučavanim medijima. Inkubacija je vršena u termostatima LTH Škofja Loka, a kao izvor svjetlosti služile su 4 fluorescentne žarulje, Gro-Lux-Sylvania, 20 W, udaljene od kultura 20 cm, s 12-satnim dnevnim noćnim ciklusom.

Ispitivan je porast broja stanica, a konstante rasta ( $k$ ) računane su po formuli (Guillard 1973):

$$k = \frac{3.322}{t_2 - t_1} \times \log \frac{N_2}{N_1},$$

gdje je  $k$  = konstanta rasta s jedinicom  $\text{dan}^{-1}$  i vrijedi samo za rast u eksponencijalnoj fazi,  $t$  = vrijeme,  $N$  = broj stanica u kulturi,  $3.322 = = \log_2 10$ . Generacijsko vrijeme ( $T$ ) je vrijeme, potrebno da se jedna stanica ili kultura udvostruči i prikazano je formulom:

$$T = \frac{1}{k}$$

## Rezultati i diskusija

Krivulje rasta alge (sl. 2. i 3) pokazuju da su faze latencije u većini pokusa bile vrlo kratke ili su posve izostale, što upozorava na veliku sposobnost prilagodbe čak i na ekstremne uvjete, kao što su npr. visoki (63‰) ili pak izrazito niski (2‰) saliniteti medija. Eksponencijalne faze rasta varirale su u danim uvjetima, ali su sve trajale 7 do 9 dana. Maksimalne dostignute koncentracije stanica iznosile su  $1.4 \times 10^7$  jedinki/ml medija.

S obzirom na različite medije u kojima je rasla (sl. 2. A), alga se najbrže razvila u obogaćenoj filtriranoj morskoj vodi. Najveća dostignuta koncentracija stanica u tom mediju iznosila je čak  $1.4 \times 10^7$  stanica/ml, naspram najvećoj koncentraciji od  $6.9 \times 10^5$  stanica/ml u istoj morskoj vodi, s istim parametrima, samo bez 2‰-tne otopine Provasoli ES. Morska voda korištena u pokusima, slanosti 36.51‰, sadržavala je prije filtracije manje od 0.01  $\mu\text{g-at P-PO}_4/\text{l}$ , 0.18  $\mu\text{g-at N-NO}_3/\text{l}$  i 0.30  $\mu\text{g-at Si-SiO}_2/\text{l}$ . Osim toga filtri zadržavaju frakcije koloida iz morske vode koji onda adsorbiraju na sebe i mikroelemente, naročito željezo i fosfate koji su neophodni za rast ove alge (Droop 1958). Ipak, u mediju neobogaćene filtrirane morske vode, uzete u području otvorenog sjevernog Jadrana, eksponencijalna faza rasta alge trajala je četiri dana. To bi se moglo pripisati djelovanju faktora rasta koji su u kulturu prispjeli s inokulumom, kao i rezervama samih stanica. Što se pak tiče sintetske morske vode kao

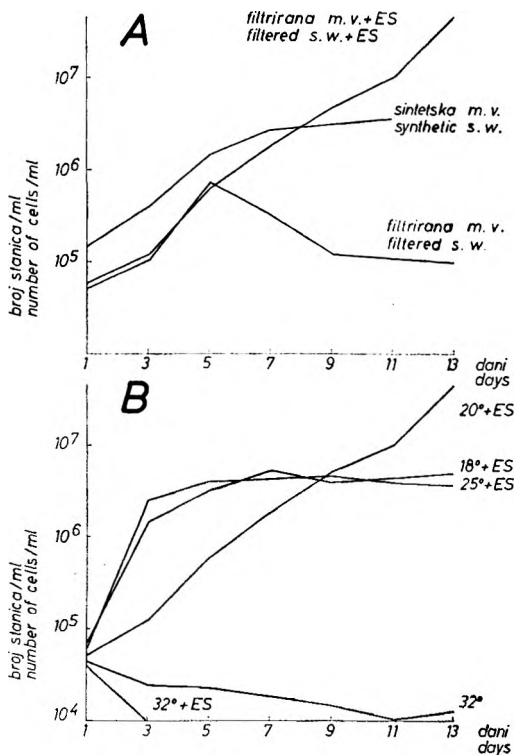


20  $\mu$ m

anoptralkontrast

Sl. 1. Morska dijatomeja *Phaeodactylum tricornutum*.  
Monokultura Ab 3—5

Fig. 1. Marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*.  
Monoculture Ab 3—5



Sl. 2. A — Rast alge *P. tricornutum* u različitim medijima: filtrirana, obogaćena filtrirana i sintetska morska voda (20 °C).

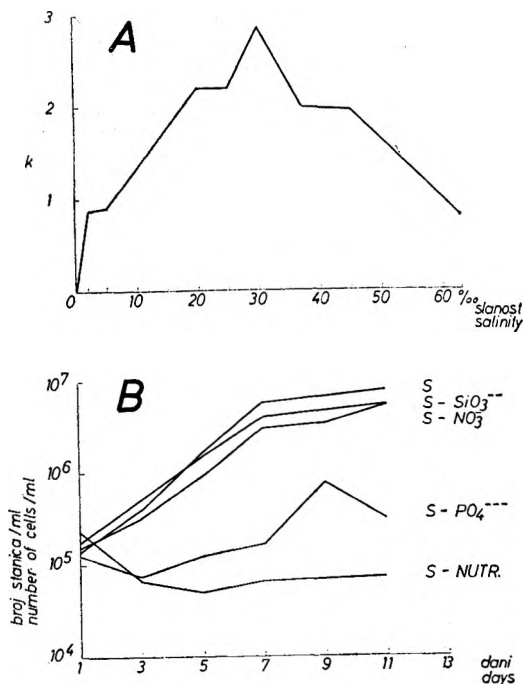
B — Utjecaj temperature na rast *P. tricornutum*. Medij: filtrirana morska voda sa ili bez hranidbene otopine Provasoli ES.

Fig. 2. A — Growth of alga *P. tricornutum* on divers media: filtered, enriched filtered and synthetic seawater (20 °C).

B — Influence of temperature on the growth rate of *P. tricornutum*. Medium: filtered seawater with or without Provasoli ES enrichment.

medija za ovu algu, ona se pokazala dobrom. Stopa rasta iznosila je 0.89, a maksimalna dostignuta koncentracija  $3.8 \times 10^6$  stanica/ml.

Utjecaj različitih temperatura na rast ove alge prikazan je na sl. 2. B. Na povišenoj temperaturi sve kemijske reakcije, uključujući tu i metabolizam i rast, odvijaju se većom brzinom. Na temperaturi od 25° C rast je bio najbrži. Konstanta rasta iznosila je 2.68, a to znači 1 dioba u 8 sati. To je međutim trajalo samo prva dva dana, nakon čega je kultura ušla u stacionarnu fazu. Stanice su brzo potrošile za rast potrebne tvari, a time je i pad njihove aktivnosti bio brži. Na temperaturi od 20° C konstanta rasta iznosila je 0.90, generacijsko vrijeme gotovo je utrostručeno, ali zato eksponencijalna faza rasta traje konstantno do jedanaestog dana. Na temperaturi od 32° C kultura je u obogaćenom mediju naglo propala nakon par dana od inokulacije. No, u morskoj vodi bez dodatka hranidbene otopine kultura je preživjela na temperaturi od 32° C do kraja pokusa. Ne-



Sl. 3. A — Konstante rasta ( $k$ ) alge *P. tricorutum* u funkciji slaniteta.

B — Hranidbene soli i njihov utjecaj na rast alge *P. tricorutum*.

Medij: sintetska morska voda (Z o B e l l 1946). S = potpuna sintetska morska voda. S — SiO<sub>3</sub> = sintetska m. v. bez silikata. S — NO<sub>3</sub> = sintetska m. v. bez nitrata. S — PO<sub>4</sub> = sintetska m. v. bez fosfata. S — NUTR. = sintetska m. v. bez hranidbenih soli.

Fig. 3. A — The growth rate constants of *P. tricorutum* as a function of salinities.

B — Nutritive salts and their influence on the growth rate of *P. tricorutum*. Medium: synthetic seawater (Z o B e l l 1946). S = complete synthetic seawater. S — SiO<sub>3</sub> = synthetic s.w. without silicates S — NO<sub>3</sub> = synthetic s.w. without nitrates. S — PO<sub>4</sub> = synthetic s. w. without phosphates. S — NUTR. = synthetic s. w. without nutrients.

mogućnost rasta u ovom posljednjem primjeru (kultura je preživjela, ali nije rasla) možda nije bila posljedica temperature već nedostatka hranidbenih soli u mediju. Zato se ne bi moglo reći da je za algu *P. tricorutum* temperatura od 32° C letalna.

Rezultati pokusa na obogaćenoj morskoj vodi različitih slanosti ukazali su na eurihalnost te vrste (sl. 3. A). Kultura je rasla na svim izabranim slanostima (vidi sliku), osim u slatkoj vodi (0‰), u kojoj je klon preživio u minimalnom broju, bez razmnožavanja. Najveća stopa rasta zabilježena je pri slanitetu od 30‰.

U seriji pokusa s hranidbenim solima (Sl. 3. B) alga se nije razmnožavala u sintetskoj morskoj vodi kojoj su manjkali fosfati, nitrati i silikati. Pojedinačnim oduzimanjem spomenutih soli pokazalo se da su toj vrsti najpotrebniji fosfati. U sintetskoj vodi bez dodatka silikata rast se neo-

metano odvijao. Razlog tome je činjenica da su, zbog posebne građe njezine frustule, zahtjevi te alge za silikatima neznatni (R a y m o n t 1980).

Rezultati djelovanja vitamina na rast alge bili su negativni. Sintet-skoj morskoj vodi dodavana je 2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>-tna otopina vitamina, i to: 10 µg vita-mina B<sub>12</sub>, 0.5 µg tiamina i 5 µg biotina u 100 ml destilirane vode. Rast alge u tako obogaćenom mediju bio je inhibiran već četvrtog dana. Povećane koncentracije svih triju vitamina smanjivale su koncentraciju stanica u kulturi. To se poklapa s nalazima drugih autora (D r o o p 1977, D a r l e y 1977, H e l l e b u s t e t L e w i n 1977) koji tvrde da je ova alga obligatan autotrof i da za svoj rast ne treba vitamine.

### Zaključci

Rezultati pokusa na monokulturi alge *P. tricornutum* pokazali su da je vrlo pogodna vrsta za različita istraživanja in vitro, što je dokazano i radovima mnogih autora. Dobro raste u sintetskoj morskoj vodi. Sjeverno-jadranska pučinska voda, filtrirana i obogaćena hranidbenom otopinom pokazala se odličnim medijem za ovu vrstu. Od ispitivanih temperatura na rast ove alge, optimalan konstantni rast zabilježen je pri 20° C, a temperatura od 32° C nije letalna. S obzirom na različite salinitete medija najveća konstanta rasta zabilježena je pri salinitetu 30‰. Rast je registriran u širokoj zoni saliniteta: od 2‰ do 63‰, a u slatkoj vodi (0‰) vrsta je preživjela. Od proučavanih hranidbenih soli, za produkciju ove alge od najvećeg su značenja fosfati. S obzirom na njenu obligatnu autotrofnost vitamini nisu potrebni za rast, naprotiv, djeluju inhibitoryno.

\*

Najljepše se zahvaljujem dr E. Marčenko (Institut »R. Bošković«, Zagreb) i dr J. Štirnu (MRIC, Piran) za pruženu mi pomoć prilikom izrade ovog rada.

### Literatura

- Ansell, A. D., J. E. G. Raymont, K. F. Lander, E. Crowley, P. Shackley, 1963 a: Studies on the mass culture of *Phaeodactylum*. II. The growth of *Phaeodactylum* and other species in outdoor tanks. *Limnol. Oceanogr.* 8, 184—206.
- Ansell, A. D., J. E. G. Raymont, K. F. Lander, 1963 b: Studies on the mass culture of *Phaeodactylum*. III. Small-scale experiments. *Limnol. Oceanogr.* 8, 207—213.
- Canzonier, W. J., R. Brunetti, 1975: Low-cost continuous algal culture system. 10<sup>th</sup> Europ. Symp. Mar. Biol. 1, 27—31.
- Darley, W. M., 1977: Biochemical composition, 198—223. In: Werner, D. (Ed.): *The biology of diatoms*. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Droop, M. R., 1958: Optimal relative and actual ionic concentration for growth of some euryhaline algae. *Verh. Intern. Ver. Limnol.* 13, 722—733.
- Droop, M. R., 1977: Organic micronutrients, 141—159. In: Lewin, R. A. (Ed.): *Physiology and biochemistry of algae*. Academic Press., New York.
- Fanuko, N., 1980: Modifikacije lagunarne fitoplanktonske zajednice u uvjetima eksperimentalne polucije. Magistarski rad. Sveučilište u Zagrebu.
- Guillard, R. R., 1973: Division rates, 289—311. In: Stein, R. J. (Ed.): *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press.

- Hellebust, J. A., J. Lewin, 1977: Heterotrophic nutrition, 169—197. In: Werner, D. (Ed.): The biology of diatoms. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Hendey, I. N., 1964: An introductory account of the smaller algae of british coastal waters. Part V. *Bacillariophyceae*. Fish. inv. Ser. IV. Her Majesty's Stat. Off., London.
- Keržan, I., J. Štirn, 1976: Pelagične alge. Znanstveno poročilo 6, Ljubljana.
- Lewin, J. C., 1958: The taxonomic position of *Phaeodactylum tricornerutum*. J. Gen. Microbiol. 18, 427—432.
- Lewin, J. C., R. A. Lewin, D. E. Philpott, 1958: Observation on *Phaeodactylum tricornerutum*. J. Gen. Microbiol. 18, 418—426.
- Nelson, D. M., C. F. D'Elia, R. R. L. Guillard, 1979: Growth and competition of the marine diatoms *Phaeodactylum tricornerutum* and *Thalassiosira pseudonana*. II. Light limitation. Mar. Biol. 50, 313—318.
- Pincemin, J. M., 1971: Action de facteurs physiques, chimiques et biotiques sur quelques dinoflagellés et diatomés en culture. These de doctorat de spécialité. Univ. D'Ais Marseille I.
- Raymont, J. E. G., 1980: Plankton and productivity in the oceans. Vol. 1. Phytoplankton. Pergamon press. Oxford. 489 pp.
- Raymont, J. E., M. N. E., Adams, 1958: Studies on the mass culture of *Phaeodactylum*. Limnol. Oceanogr. 3, 119—136.
- Ukeles, R., 1976: Cultivation of plants. In: Kinne, O. (Ed.): Marine ecology. Vol. III. Cultivation, Part 1, 376—466, John Willey Ltd. London.
- ZoBell, C. E., 1946: Marine microbiology. The Chronica Botanica Co. Waltham. 240 pp.

## SUMMARY

### ON THE GROWTH OF MARINE DIATOM *PHAEODACTYLUM TRICORNERUTUM* IN THE BATCH CULTURE

*Neda Fanuko*

(Marine Research and Training Centre Piran, University of Ljubljana)

The growth of *Phaeodactylum tricornerutum* — the monoculture Ab 3—5 (Fig. 1) in laboratory conditions was investigated. The influence of various media, temperature (Fig. 2), salinity, nutrients (Fig. 3) and vitamins upon the growth rate of the alga was observed. The results showed the most intensive growth in the filtered north-adriatic seawater enriched with the Provasoli ES solution. In the temperature range from 18° C to 32° C the alga survived but the best growth was registered at 20° C. The growth was observed in the salinity range from 2‰ to 63‰. The clone growing in 0‰ salinity medium (fresh water) did not reproduce but it survived. Phosphates appeared to be indispensable for the growth of the alga (Fig. 3 B). Vitamins B<sub>12</sub>, biotin and thiamine acted as inhibitors on the growth of *P. tricornerutum*.

*Neda Fanuko, mr. biol.*  
Morski raziskovalni in izobraževalni center  
JLA 65  
YU-66330 Piran (Jugoslavija)