

БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ**РОСТОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* BOHLIN ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ ОСВЕЩЕНИИ И СВЕТО-ТЕМНОВЫХ ЦИКЛАХ**

А.Л. АВСИЯН

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского НАН Украины,
г. Севастополь**Введение**

Физиологические характеристики микроводорослей в значительной мере определяются световым обеспечением клеток, в том числе и световым режимом.

Для различных видов низших фототрофов показано влияние продолжительности светового периода на интенсивность фотосинтеза, продуктивность, скорость деления клеток, потребление углерода [1, 6, 10]. Зачастую продуктивность клеток в условиях свето-темновых циклов была выше, чем при непрерывном освещении [6]. Так, для *Arthrospira platensis* нами ранее было показано увеличение продуктивности на свету при фотопериоде 16 ч. по сравнению с постоянным освещением [1]. Такое воздействие обусловлено не только различиями в обеспечении световой энергией, но и соотношением между фотосинтезом и дыханием, а также условиями углеродного обеспечения в культуре [6, 10].

Phaeodactylum tricornutum Bohlin – диатомовая микроводоросль, широко используемая как модельный объект, а также являющаяся перспективным объектом альгобиотехнологии в качестве источника полиненасыщенных жирных кислот [8, 12].

Целью данной работы было исследование ростовых характеристик *P. tricornutum* при накопительном культивировании в условиях непрерывного освещения и при свето-темновых циклах.

Объекты и методы исследования

В эксперименте использовали одноклеточную диатомовую водоросль *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin из коллекции культур ИнБЮМ. Культивирование осуществляли в накопительном режиме на питательной среде Тренкеншу [2] в культиваторах плоскопараллельного типа объемом 3 л с толщиной слоя культуры 5 см. В контрольном варианте выращивание проходило при непрерывном освещении, в опытном варианте – в условиях свето-темнового режима 16 ч. : 8 ч. (свет : темнота). Освещенность рабочей поверхности культиваторов составляла 10 кЛк, температура в светлое время – 17–18°C, в темное время – 14–16°C. Перемешивание культуры осуществляли посредством барботирования воздуха в светлое время. Ежедневно в начале и конце темного периода отбирали пробы в 3-х повторностях, в которых измеряли рН, оптическую плотность культуры на длине волны 750 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3 и подсчитывали численность клеток в камере Горяева [5].

Биомассу (абсолютно сухой вес) вычисляли, используя коэффициент перехода от оптической плотности $k_{D750} = 0,576 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл.}^{-1}$ [8].

Ночную потерю биомассы (как % от биомассы в конце светового периода) определяли следующим образом [7]:

$$L_B = \frac{B_L' - B_D}{B_L'} \cdot 100\% .$$

НПБ (как % от продуктивности за предыдущий световой период):

$$L_p = \frac{B_L' - B_D}{B_L' - B_D'} \cdot 100\% ,$$

где B_L' – плотность биомассы в конце предыдущего светового периода (мг абсолютно сухого вещества (АСВ)·л⁻¹), B_D – плотность биомассы в конце темного периода (мг АСВ·л⁻¹), B_D' – плотность биомассы в конце предыдущего темного периода (мг АСВ·л⁻¹).

Максимальную продуктивность определяли на линейной стадии роста, аппроксимируя данные следующим уравнением [3]:

$$B = P_m \cdot (t - t_l) + B_l,$$

где B – биомасса, мг · л⁻¹; P_m – максимальная продуктивность, мг · л⁻¹ · ч⁻¹; t – время, ч.; B_l – биомасса в начале линейной фазы роста, т.е. при $t = t_l$.

Результаты и обсуждение

Микроводоросли культивировались в накопительном режиме до достижения ими стационарной фазы роста по накоплению биомассы. Накопительные кривые роста *P. tricornutum* по сухому весу и по численности клеток представлены на рис. 1.

Начальная плотность культуры в обоих культиваторах составляла 60 мг · л⁻¹ абсолютно сухого вещества (рис. 1 А). В обоих вариантах опыта не наблюдалось экспоненциальной фазы роста по биомассе, либо она была слишком коротка для того, чтобы быть зафиксированной. Максимальная биомасса B_m для варианта с непрерывным освещением составила 436,2 мг · л⁻¹, для культуры в условиях фотопериода B_m достигала 308,1 мг · л⁻¹, то есть была в полтора раза меньше и соответствовала отношению суммарно полученной клетками световой энергии (16 ч. : 24 ч.).

Максимальная продуктивность P_m при постоянном освещении составила 6,74 мг · л⁻¹ · ч⁻¹, для свето-темновых циклов среднесуточное значение $P_m = 4,0$ мг · л⁻¹ · ч⁻¹. Максимальная продуктивность в течение только световых периодов была равна $P_m = 6,76$ мг · л⁻¹ · ч⁻¹, то есть не отличалась от продуктивности в условиях постоянного освещения. Это согласуется с работами других авторов [12], где показано увеличение продуктивности *P. tricornutum* при постоянном освещении по сравнению с фотопериодом, но отсутствуют точные значения максимальной продуктивности.

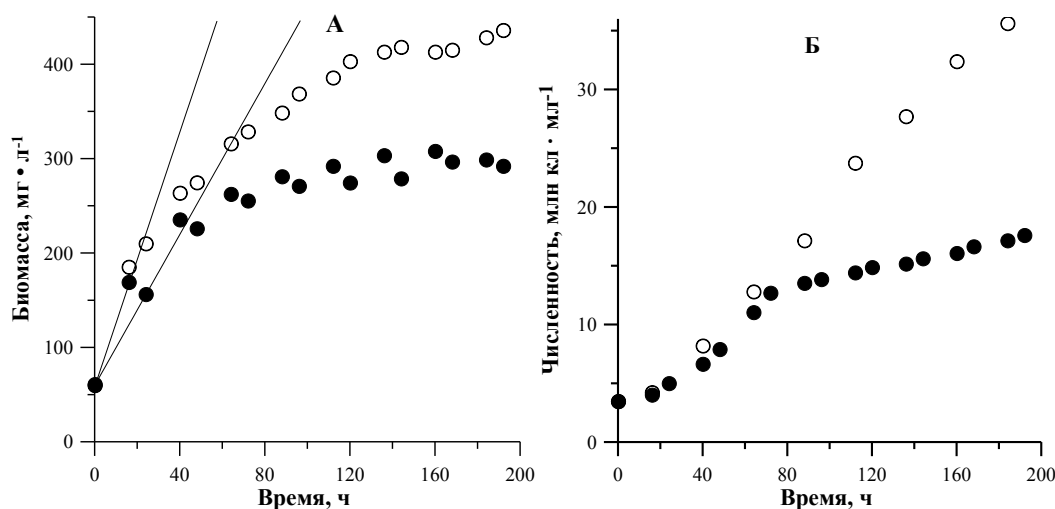


Рис. 1. Динамика биомассы (А) и численности клеток (Б) в накопительной культуре *P. tricornutum*; ● – свето-темновой цикл 16 ч. : 8 ч., ○ – непрерывное освещение

Начальная численность клеток в обоих вариантах опыта составляла $3,48 \cdot 10^6$ кл · мл⁻¹. В течение первых трёх суток наблюдалась фаза экспоненциального роста, затем переходившая в линейную (рис. 1 Б). Максимальная численность N_m в условиях постоянного освещения была в два раза выше, чем при свето-темновых циклах. Максимальная скорость деления в двух вариантах опыта достоверно не отличалась, составляя в обоих случаях 0,039 ч.⁻¹. По литературным данным, у диатомовых водорослей [9] и, в частности, у *P. tricornutum* [9, 11] деление клеток происходит преимущественно ночью. В данном эксперименте деление происходило как на свету, так и в темноте, но имеется тенденция к более высоким значениям скорости деления клеток в течение темного периода.

В процессе накопительного культивирования *P. tricornutum* в обоих вариантах опыта наблюдалось изменение соотношения биомассы к численности клеток, то есть изменялись масса и размер каждой отдельной клетки (рис. 2).

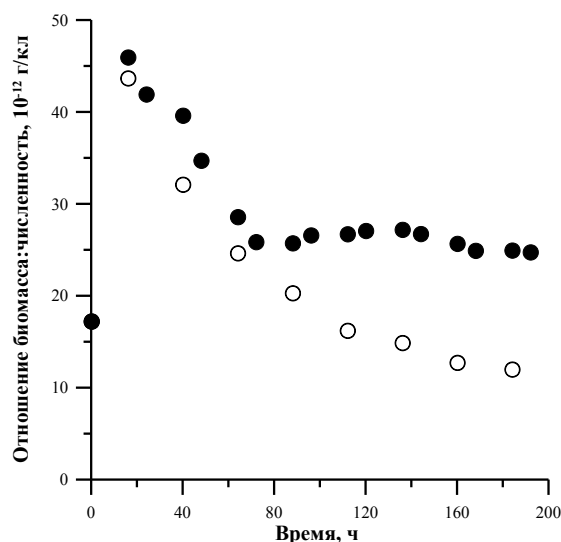


Рис. 2. Динамика отношения биомассы к численности клеток в накопительной культуре *P. tricornutum*; ● – светотемновой цикл 16 ч. : 8 ч., ○ – непрерывное освещение

Отношение биомасса/численность B/N для светотемнового режима изменялось от 45,97 до 24,77 10^{-12} г/ккл. При постоянном освещении отношение B/N снижалось от 43,7 до 12,02 10^{-12} г/ккл. Изменение размеров клеток при накопительном культивировании вызвано, по-видимому, изменением условий светового обеспечения. Чем выше плотность культуры, тем мельче становились клетки, что способствовало увеличению отношения поверхности к объёму и лучшему поглощению световой энергии.

При культивировании микроводорослей в условиях светотемновых циклов важной характеристикой, влияющей на общую продуктивность, является ночная потеря биомассы (НПБ). НПБ отражает общее снижение биомассы в течение темного периода и выражается как процент от биомассы или продуктивности [7]. Данные о динамике НПБ в накопительной культуре *P. tricornutum* представлены на рис. 3.

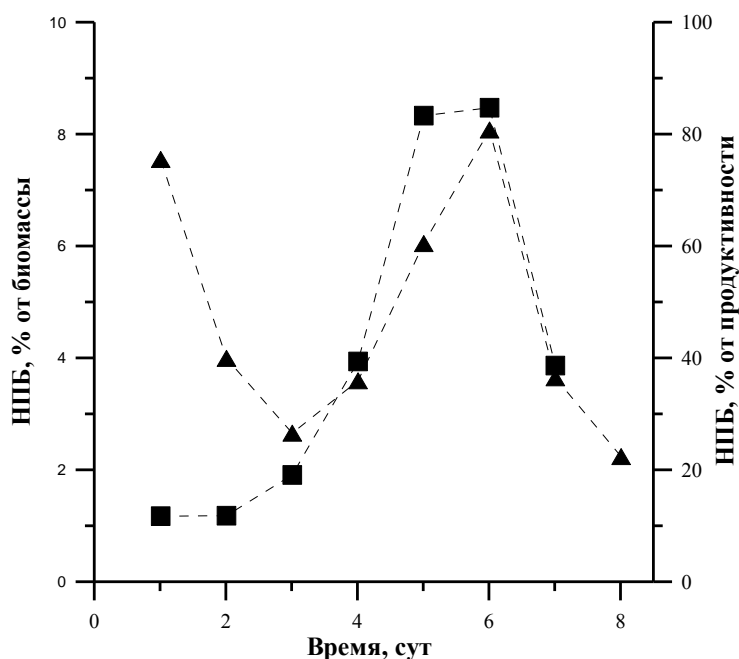


Рис. 3. Ночная потеря биомассы в накопительной культуре *P. tricornutum*; ▲ – НПБ как % от биомассы; ■ – НПБ как % от продуктивности за предыдущий световой период

Минимальное значение НПБ как процент от биомассы $L_B = 2,67\%$ наблюдалось на третьи сут. эксперимента. Минимальное значение НПБ как процент от продуктивности за световой период $L_P = 11,83\%$ было на первые сут. эксперимента, что обусловлено не только низкими темновыми потерями, но и высокой продуктивностью за этот период. Выше всего значения НПБ были на стадии замедления роста на шестые сут. эксперимента ($L_B = 8,09\%$, $L_P = 84,8\%$). Стоит также отметить, что в течение темнового периода происходило снижение pH культуры, обусловленное выделением CO_2 в процессе темнового дыхания.

Изменение НПБ на разных фазах роста накопительной культуры вероятно обусловлено изменением интенсивности метаболизма клеток и, возможно, изменением их биохимического состава. По данным [11], в течение темнового периода у *P. tricornutum* происходит расход углеводов и синтез белка, содержание липидов остаётся практически неизменным.

Выводы

Исследованы ростовые характеристики у *P. tricornutum* в условиях непрерывного освещения и свето-темнового режима 16 ч. : 8 ч. Показано, что продуктивность и максимальная биомасса при постоянном освещении были выше, чем в условиях фотопериода. При этом не наблюдалось повышения продуктивности в течение светового периода при свето-темновом режиме, что характерно для некоторых других микроводорослей. Возможно, это обусловлено более эффективными механизмами потребления углерода, благодаря которым у *P. tricornutum* не происходит ингибирования синтетических процессов при постоянном освещении [8]. В процессе накопительного культивирования с ростом биомассы изменяется ее соотношение к численности клеток. Ночная потеря биомассы была различной на разных стадиях роста культуры. Для получения максимальной продукции в условиях свето-темновых режимов рекомендуется учитывать не только продуктивность микроводорослей на свету, но и её соотношение с НПБ.

Список литературы

1. Авсиян А. Л., Лелеков А. С. Влияние светового режима на продуктивность культуры *Spirulina platensis* // Pontus Euxinus – 2011: Тез. VII междунар. науч.-практ. конф. мол. учёных по проблемам водных экосистем, Севастополь, 24-27 мая 2011 г. – Севастополь, 2011. – С. 16-18.
2. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ин-т физ. АН СССР. – Красноярск, 1984. – 28 с.
3. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 89-97.
4. Тренкеншу Р. П., Авсиян А. Л. Темновое дыхание как фактор потери биомассы микроводорослей // Экология моря. – 2009. – Вып. 79. – С. 63-66.
5. Топачевский А. В. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике – К.: Наук. думка, 1975. – 247 с.
6. Шушанашвили В. И., Семененко В. Е. Влияние свето-темновых периодов и интенсивности света на фотосинтез, прирост биомассы и скорость деления автотрофных клеток эвглены // Физиология растений. – 1985. – Т. 32, Вып. 2. – С. 323-331.
7. Hu Q., Guterman H., Richmond A. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities // J. Phycol. – 1996. – Vol. 32. – P. 1066-1073.
8. Meiser A., Schmid-Staiger U., Trösch W. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornerutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor // J. Appl. Phycol. – 2004. – Vol. 16. – P. 215-225.
9. Nelson D. M., Brand L. E. Cell division periodicity in 13 species of marine phytoplankton on a light-dark cycle // J. Phycol. – 1979. – Vol. 15. – P. 67-75.
10. Rost B., Riebesell U., Sültemeyer D. Carbon acquisition of marine phytoplankton: effect of photoperiod length // Limnol. Oceanogr. – 2006. – Vol. 51, No 1. – P. 12-20.
11. Terry K. L., Hirata J., Laws E. A. Light-limited growth of two strains of the marine *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin: Chemical composition, carbon partitioning and the diel periodicity of physiological processes // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1983. – Vol. 68. – P. 209-227.
12. Yongmanitchai W., Ward O. P. Growth and eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornerutum* in batch and continuous culture systems // J. Am. Oil Chem. Soc. – 1992. – Vol. 69, No. 6. – P. 584-590.

Рекомендовано к печати к.б.н. Садогурским С.Е.