

УДК 582.263:581.143

ДИНАМИКА ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ И РАСТВОРЕННОГО ОРГАНИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* В УСЛОВИЯХ СВЕТО-ТЕМНОВОГО РЕЖИМА

А.Л. АВСИЯН

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского, г. Севастополь

В данной работе была исследована динамика плотности культуры, численности и содержания растворённого органического вещества в среде при культивировании зелёной микроводоросли *D. salina* в накопительной культуре в условиях свето-темнового режима. Были определены значения максимальной биомассы и продуктивности при двух различных освещённостях культуры, а также величина темновой потери биомассы и соотношения биомассы и численности клеток (показателя среднего размера клетки) на разных стадиях накопительного культивирования.

Ключевые слова: свето-темновой режим, темновая потеря биомассы, выделение, *Dunaliella salina*, продуктивность.

Введение

Исследование динамики роста микроводорослей в накопительной культуре имеет большое значение для определения продукционных характеристик в различных условиях.

Нами ранее было показано, что свето-темновой режим оказывает значительное влияние на рост и продуктивность микроводорослей и цианобактерий, а также, что величина темновой потери биомассы существенно изменяется на разных стадиях накопительного культивирования [1, 2]. Потери биомассы могут быть обусловлены различными процессами – темновым дыханием, выделением, отмиранием клеток. Для *D. salina* показано, что выделение может составлять 5 – 10% от фотосинтеза [8], однако данные о величине темновой потери биомассы полностью отсутствуют, в связи с этим целью данной работы было исследование закономерностей роста и потерь биомассы микроводоросли *D. salina* при накопительном культивировании в условиях свето-темнового режима.

Объекты и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали одноклеточную зелёную галобную водоросль *Dunaliella salina* Teod. из коллекции культур ИнБИОМ. Культивирование осуществляли в накопительном режиме на питательной среде Тренкеншу, доведенной до солёности $60 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ [5]. Использовали культиваторы плоскопараллельного типа объемом 3 л, с толщиной слоя культуры 5 см, освещённость рабочей поверхности культиваторов составляла 10 кЛк в первом варианте и 6 кЛк во втором варианте опыта; свето-темновой режим – 16 ч.: 8 ч. (свет: темнота). Температура в светлое время составляла $33 \pm 1^\circ\text{C}$, в темное время – $25 \pm 1^\circ\text{C}$. В светлое время культура перемешивалась путем барботирования воздухом. Ежедневно в начале и конце темнового периода отбирали пробы в трёх повторностях, в которых измеряли оптическую плотность культуры на длине волны 750 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3, подсчитывали численность клеток в камере Горяева [7] и определяли концентрацию растворённого органического вещества (РОВ) методом серно-хромового мокрого окисления.

Биомассу (абсолютно сухой вес) вычисляли, используя коэффициент перехода от оптической плотности: $k = 0,78 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$, $ACB = k \cdot D_{750}$ [3].

Результаты и обсуждение

В ходе накопительного культивирования плотность культуры *D. salina* возрастала от $0,07 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ до $0,36 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ при освещённости 10 кЛк и до $0,27 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ при освещённости 6 кЛк (рис. 1 А). В обоих вариантах опыта с четвёртых суток эксперимента начиналась стадия замедления роста.

При большей освещённости максимальная продуктивность P_m составила $3,2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, при меньшей – $P_m = 2,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$.

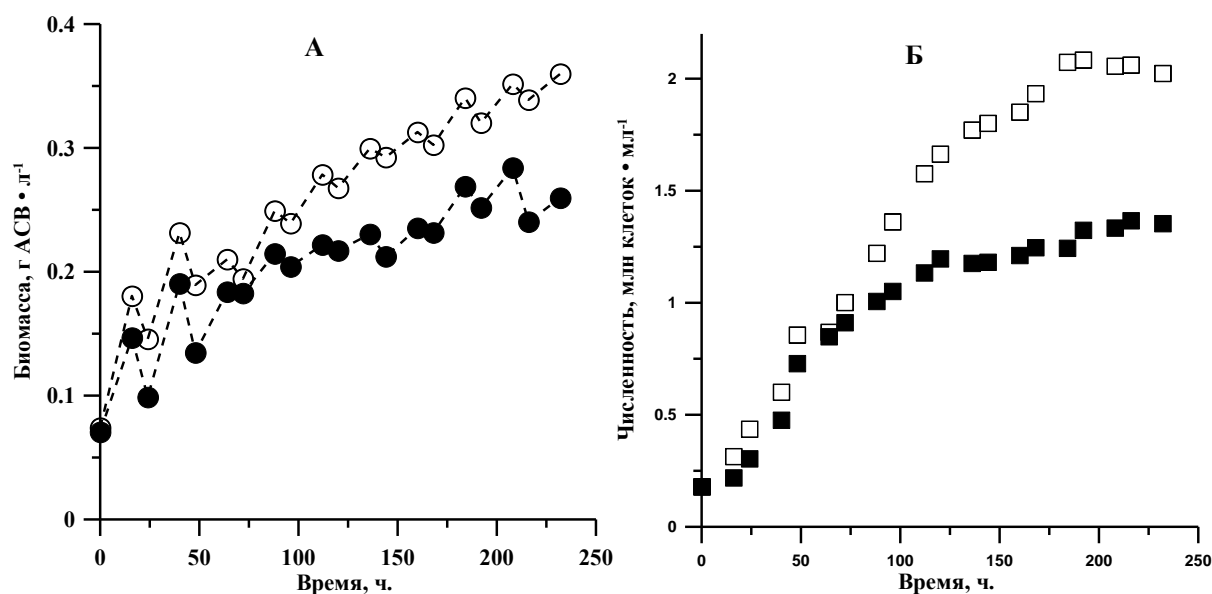


Рис. 1 Динамика биомассы (А) и численности клеток (Б) в накопительной культуре *D. salina*; освещённость: белые маркеры – 10 кЛк, чёрные маркеры – 6 кЛк

Начальная численность клеток в обоих вариантах опыта составляла $1,8 \cdot 10^5$ кл · мл⁻¹ (рис. 1 Б). При большей освещённости (10 кЛк) линейный рост продолжался до шестых суток культивирования и максимальная численность составила $2,05 \cdot 10^6$ кл · мл⁻¹. При меньшей освещённости (6 кЛк) линейный рост прекращался раньше, на четвёртые сутки эксперимента, и максимальная численность составила $1,35 \cdot 10^6$ кл · мл⁻¹. Деление клеток происходило как в светлое, так и в темное время. Имеются данные, что пики активности деления у *D. salina* наблюдаются как на свету, так и в темноте, но более активно деление происходит в темноте [11].

В течение первых трёх суток культивирования соотношение между биомассой и численностью клеток существенно снижалось в обоих вариантах опыта (рис. 2), а затем стабилизировалось на уровне $0,15 - 0,2 \cdot 10^9 \text{ г} \cdot \text{кл}$. Можно отметить, что это соотношение (а значит, и средний размер клетки) в течение темного периода снижалось на 5 – 12%. Это может быть связано как с темновой потерей биомассы путём дыхания, так и с активным делением клеток в темноте.

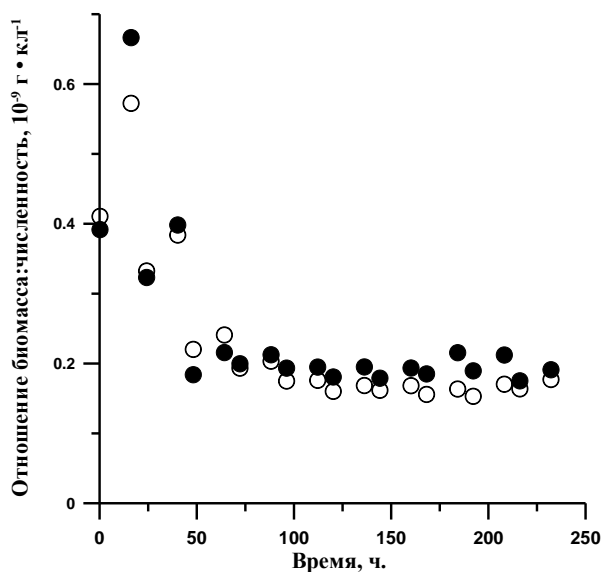


Рис. 2 Динамика отношения биомассы к численности клеток в накопительной культуре *D. salina*; освещенность: белые маркеры – 10 кЛк, чёрные маркеры – 6 кЛк

На среднесуточную продуктивность культуры большое влияние оказывает расход биомассы в темноте. Ночная потеря биомассы (НПБ) может выражаться как процент от биомассы в начале темного периода, либо как процент от продуктивности за предыдущий световой период.

При культивировании *D. salina* в накопительной культуре происходило изменение величины НПБ в очень широких пределах (рис. 3). Для варианта с освещённостью 10 кЛк максимальное значение НПБ составило 19,2 % от биомассы в первые сутки и 75% от продуктивности на третьи сутки культивирования. Для варианта с освещённостью 6 кЛк наибольшая НПБ как доля от биомассы отмечена также в первые сутки (32,7%). На шестые и девятые сутки культивирования в этом варианте НПБ превышала продуктивность за предыдущий световой период, составляя 135%. Самые низкие значения НПБ как доли от биомассы для обоих вариантов отмечены на третьи - восьмые сутки культивирования (2,5 – 7%).

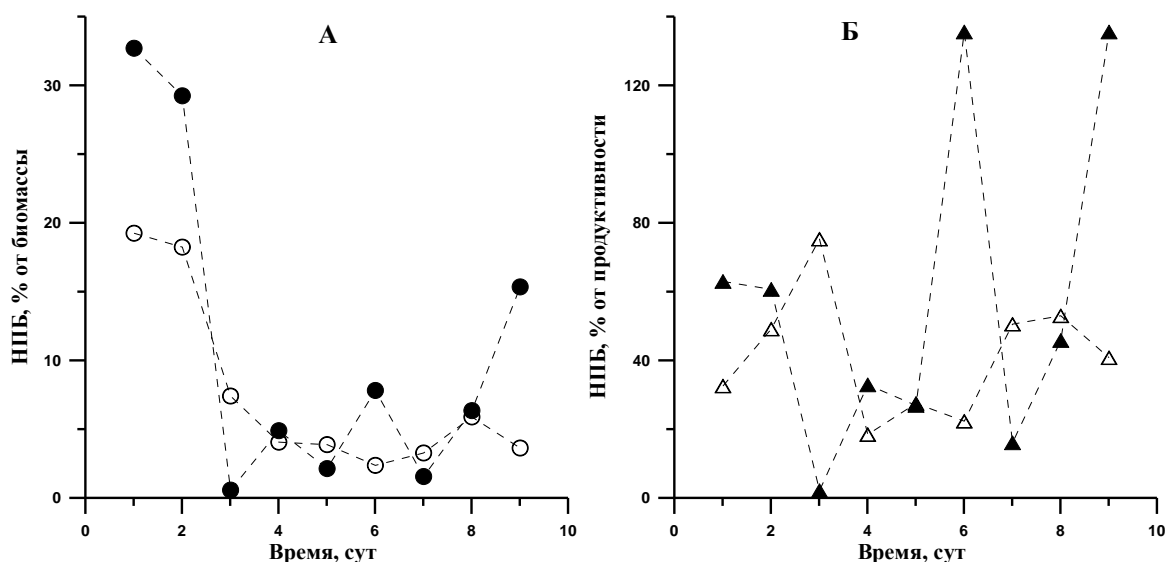


Рис. 3 Ночная потеря биомассы в накопительной культуре *D. salina* (А – НПБ как % от биомассы; Б – НПБ как % от продуктивности за предыдущий световой период); освещенность: белые маркеры – 10 кЛк, чёрные маркеры – 6 кЛк

Одним из компонентов потери биомассы может являться выделение клетками микроводорослей экзометаболитов в среду. Была исследована динамика содержания растворённого органического вещества (РОВ) в культуральной среде (рис. 4).

В течение первых двух суток культивирования происходило активное выделение экзометаболитов с повышением содержания РОВ до $260 \text{ мг ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ в варианте с освещённостью 10 кЛк и до $354 \text{ мг ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ в варианте с освещённостью 6 кЛк. Затем содержание РОВ в среде постепенно снижалось до начальных значений в обоих вариантах опыта. Это может быть обусловлено либо поглощением РОВ культурой *D. salina*, либо поглощением и минерализацией экзометаболитов сопутствующей микрофлорой.

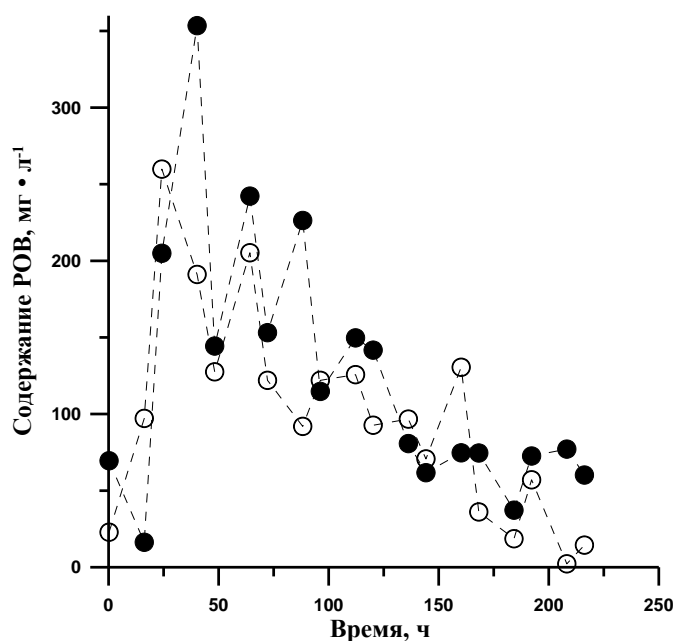


Рис. 4 Содержание РОВ в культуральной среде в течение накопительного культивирования *D. salina*; освещенность: белые маркеры – 10 кЛк, чёрные маркеры – 6 кЛк

Чётких суточных закономерностей в динамике изменения содержания РОВ в среде выявить не удалось. В течение темного периода органическое вещество могло как выделяться в среду, так и потребляться. Высокие значения РОВ в начале культивирования, вероятно, могут быть обусловлены стрессом клеток при помещении в новые условия, при дальнейшей адаптации выделение снижается.

Выводы

Исследована динамика плотности культуры, численности, ночной потери биомассы и содержания РОВ в среде при культивировании зелёной микроводоросли *D. salina* в накопительной культуре в условиях свето-темнового режима. Определены значения максимальной биомассы и продуктивности для данных условий при двух различных освещённостях культуры. Показана динамика соотношения биомассы и численности клеток (показателя среднего размера клетки), а также отмечены суточные колебания этого параметра. Выявлено, что ночная потеря биомассы может иметь весьма большие значения при культивировании *D. salina* в накопительном режиме, составляя до 32% от биомассы в начале темного периода. Выделение экзометаболитов также играет значительную роль в балансе ростовых процессов и потерь биомассы, однако закономерности суточной динамики органического вещества в среде не выявлены.

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. Авсиян А.Л. Ростовые характеристики *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin при непрерывном освещении и свето-темновых циклах // Бюл. ГНБС. – 2012. – Вып. 105. – С. 125 – 130.
3. Боровков А.Б. Динамика пигментов и роста морских микроводорослей в хемостате на примере *Dunaliella salina* Теод.: Автореф. дис... канд. биол. наук / ИнБИОМ. – Севастополь, 2008. – 31 с.
4. Сапожников В.В. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 118 с.
5. Тренкениш 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.
6. Тренкениш Р.П., Авсиян А.Л. Темновое дыхание как фактор потери биомассы микроводорослей // Экология моря. – 2009. – Вып. 79. – С. 63 – 66.
7. Топачевский А.В. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – К.: Наук. думка, 1975. – 247 с.
8. Giordano M., Davis J. S., Bowes G. Organic carbon release by *Dunaliella salina* (Chlorophyta) under different growth conditions of CO₂, nitrogen, and salinity // J. Phycol. – 1994. – Vol. 30. – P. 249 – 257.
9. 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.
10. 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.

Статья поступила в редакцию 12.09.2013 г.

Avsiyan A.L. Dynamics of culture density and dissolved organic substance at cultivation of the microalga *Dunaliella salina* in conditions of light-dark cycle. // Bul. Nikit. Botan. Gard. – 2014. – № 111. – P. 21 – 26.

The dynamics of culture density, number and content of dissolved organic substance during cultivation of green microalga *D. salina* in culture in conditions of light-dark cycle has been given in this article. The meaning of maximum biomass and productivity during two different types of lightening of culture and also the quantity of darkness lost of biomass and the correlation of biomass and number of cells (index of average cell's size) on different stages of cultivation have been determined.

Key words: *light-dark cycle, darkness lost of biomass, obtaining, Dunaliella salina, productivity.*