

УДК 581.14:582.263

## ВЛИЯНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ НА РОСТ ПОПУЛЯЦИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Л. Н. ЦОГЛИН, М. Г. ВЛАДИМИРОВА

*Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва*

Изменение удельного коэффициента размножения и скорости роста численности популяции микроводорослей отстает от изменения условий культивирования на время, равное длительности светонезависимой стадии развития клеток. Инерционность ростовых характеристик связана с тем, что в момент перехода к новым условиям культивирования во всех клетках, находящихся на светонезависимой стадии развития и наиболее близких к делению, уже заложено определенное число автоспор, соответствующее прежнему световому режиму. В жизненном цикле клетки микроводорослей существует относительно короткий интервал времени, в течение которого суммарной интенсивностью света определяется число формирующихся автоспор. Для применявшегося в экспериментах штамма *Chlorella sp. K* этот интервал определен в пределах 2 час. Особенности индивидуального цикла развития микроводорослей существенно влияют на всю динамику роста численности популяции.

Рост численности микроводорослей при накопительном выращивании аналогично другим популяциям микроорганизмов изображают S-образной кривой, в которой выделяют четыре стадии: лаг-фазу, стадию логарифмического роста, линейную фазу и выход на плато. Наличие лаг-фазы свидетельствует об адаптивной реакции клеток в ответ на изменение внешних или внутренних условий культивирования при пересевах и резких разбавлениях культуры. Ряд экспериментов [1] показал, что ответная реакция заключается не только в появлении лаг-фазы. Она распространяется дальше, выражаясь в запаздывании изменений ростовых характеристик культуры, и накладывает отпечаток на всю динамику роста числа клеток. Изучение характера роста различных форм одноклеточных водорослей позволило установить связь этого явления с жизненным циклом и особенностями развития клеток. Инерционность ростовых характеристик [1—3] оказывает существенное влияние не только на процессы роста численности популяции, но и на некоторые физиологические параметры.

Скорость роста числа клеток определяется, с одной стороны, удельным коэффициентом размножения ( $\mu$ ), с другой — распределением клеток по возрастам, т. е. отношением числа делящихся и взрослых клеток к общей численности популяции [2—4], которое определяет состояние культуры в данный момент времени. Возрастное распределение в асинхронной культуре непосредственно связано с коэффициентом  $\mu$  [3, 4] и, следовательно, с условиями культивирования. Изменение возрастной функции представляет собой еще более инерционный процесс, чем изменение  $\mu$ , и отстает от него по крайней мере на время, равное длительности жизненного цикла. Влияние этого параметра, таким образом, может проявиться лишь через достаточно большое время, тогда как отмеченные в нашей работе [1] изменения ростовых характеристик связаны с инерционностью коэффициента удельного размножения.

Коэффициент удельного размножения может быть выражен соотношением [3, 4],

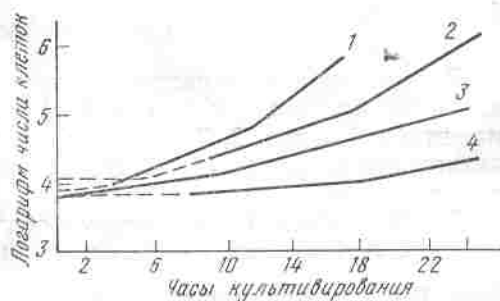
$$\mu = \frac{\ln a}{T},$$

из которого следует, что изменение  $\mu$  может быть вызвано только двумя причинами: сдвигом в ту или иную сторону среднестатистического числа автоспор в клетках ( $a$ ) или изменением длительности жизненного цикла ( $T$ ).

Исследования, проведенные на синхронной культуре [5, 6], показывают, что величины  $a$  и  $T$  определяются разными факторами культивирования. Свет в широком интервале интенсивностей не влияет на длитель-

Рис. 1. Рост числа клеток в логарифмическом масштабе при пересеве культуры из сосудов, выращиваемых на люминесцентных лампах, в камеру с тонким слоем суспензии и освещением от ксеноновой лампы

1 — *Chlorella* sp. K, 2 — *Chlorella* GO-40, 3 — *Scenedesmus* obl. 125, 4 — *Chlorella* vulg. 7-23-1



ность жизненного цикла, а среднее число автоспор находится в прямой зависимости от этого фактора. В свою очередь наблюдается непосредственная связь между длительностью цикла и температурой.

В большинстве случаев при культивировании микроводорослей и пересевах происходит увеличение интенсивности света с сохранением температурного режима, и можно с достаточной уверенностью сказать, что изменение коэффициента  $\mu$  связано с переходом клеток к делению на новое число автоспор, о чем также свидетельствует относительно резкий характер увеличения скорости роста, полученный в наших экспериментах (рис. 1). Естественно, что этот переход не может произойти мгновенно вслед за увеличением интенсивности света, поскольку изменение светового фактора оказывает действие только на клетки, находящиеся на стадии активного роста (световая стадия развития), и никак не влияет на количество уже заложенных автоспор в клетках, близких к делению. В течение времени, равного длительности светонезависимой стадии развития ( $L_3 \rightarrow L_4$ , по Тамияя [7]),  $\mu$  будет сохранять прежнее значение. Резкий характер процесса изменения ростовых характеристик штаммов исключает возможность влияния света на число автоспор на всей стадии активного роста. Очевидно, число автоспор определяется суммарным количеством световой энергии, получаемым клеткой во 2-й половине стадии активного роста. Это было показано ранее в исследованиях [8, 9], проведенных на синхронной культуре. Однако ни одна из работ не позволяет точно определить временные границы влияния света на число формирующихся в клетке автоспор. Изучение этого вопроса потребовало проведения специального эксперимента, явившегося продолжением предыдущих опытов, описанных в работе [1].

#### МЕТОДИКА

Опыты, как и в работе [1], проводили на установке для интенсивного выращивания микроводорослей [10], позволяющей работать в широком интервале интенсивностей света. В качестве источника света использовали ксеноновую лампу ДКСТВ-6000. Реактор представлял собой термостатированную камеру с плоскопараллельными стенками. Объем суспензии в реакторе — 1 л при толщине слоя 6 мм. Температуру суспензии поддерживали на уровне  $36 \pm 0,3^\circ$ . В реактор подавали газозвоздушную смесь с

коэффициентом вентиляции 300 л/час на 1 л суспензии при концентрации  $\text{CO}_2$   $1,7 \pm 0,1\%$ . В качестве питательной среды использовали среду Таммля с нитратным азотом. В ходе эксперимента контролировали число клеток прямым подсчетом под микроскопом в камере Горяева с взятием проб через каждые 30 мин., среднестатистическое число автоспор на клетку и средний размер клеток через каждый 3—4 часа, величину фотосинтетической активности суспензии по разности концентрации  $\text{CO}_2$  в газовой смеси на входе и выходе реактора с помощью оптико-акустического газоанализатора ОА-2209 в сочетании с командным прибором КЭП-12У. Для засева использовали культуру *Chlorella* sp. K после предварительного подращивания ее в культуральных сосудах на люминесцентных лампах [11]. Временные соотношения жизненного цикла клеток, предварительно определенные в тех же условиях на синхронной культуре, равны 11 час. (длительность цикла) и 4 часа (светонезависимый период).

Интенсивность света на поверхности реактора была равна  $460 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек.}$  В конце эксперимента на 29-м часу культивирования облученность уменьшили до  $40 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек.}$ , а на 32-м часу подняли до прежнего значения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рост числа клеток популяции при пересеве и резком изменении освещенности представлен на рис. 2, А в линейном и полулогарифмическом масштабе. На рис. 2, Б приведен процесс изменения фотосинтетической активности популяции в целом и в пересчете на клетку для первых 20 час. эксперимента.

Рисунок показывает, что после обычной в данных условиях для *Chlorella* sp. K 4-часовой лаг-фазы начинается рост плотности суспензии с

Изменение числа автоспор в клетках в различные периоды роста культуры

Число автоспор	Число клеток, делящихся на «а» автоспор, % от суммы делящихся клеток						
	1	2	3	4	5	6	7
	засев (культуры из сосуда)	через 5 час. культивирования, $\mu = 0,1$	через 8,5 час. (переходная стадия)	через 11 час. культивирования, $\mu = 0,53$	через 20 час. $N = 1270 \times 10^6$ , $\mu = 0,09$	через 6 час. после разбавления культуры в 25 раз	через 2 часа после затенения, $\mu = 0,49$
2	62,5	78,6	42,8	7,2	26,5	26,3	10,7
4	37,5	21,4	27,3	26,4	66,7	68,4	46,3
8	0	0	23,4	24,6	6,8	5,3	39,0
16	0	0	6,5	27,3	0	0	2,5
32	0	0	0	14,5	0	0	1,5

коэффициентом  $\mu = 0,105 \text{ час}^{-1}$ , соответствующим условиям выращивания засева в культуральных сосудах. Число автоспор в делящихся клетках в этот период также сохраняется на прежнем уровне (см. таблицу, столбцы 1 и 2). Только после 4 час. культивирования от конца лаг-фазы (время, равное длительности светонезависимой стадии развития) коэффициент  $\mu$  начинает расти и достигает величины  $0,53 \text{ час}^{-1}$ , характерной для данных световых условий ( $460 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек.}$ ). Переход сопровождается постепенным увеличением числа автоспор в клетках (см. таблицу, столбец 3), и к 10—12 час. (см. таблицу, столбец 4) основная масса клеток делится на 8, 16 и 32 (рис. 3), а в отдельных случаях даже на 64 автоспоры. К этому моменту размер клеток достигает максимального значения.

Появление в популяции клеток, делящихся на большое число автоспор, приводит к сдвигу в возрастном распределении в сторону увеличения относительного количества молодых клеток, что в свою очередь через время, равное сумме длительностей лаг-периода, светонезависимой стадии и жизненного цикла (19—20 час. от начала культивирования в нашем эксперименте), должно привести к некоторому повышению скорости роста популяции. Но при плотности засева в  $22 \cdot 10^6$  клеток/см<sup>3</sup> через 20 час. определяющим фактором явилось световое ограничение из-за высокой плотности суспензии, вызвавшее снижение  $\mu$  до  $0,09 \text{ час}^{-1}$ .

В делении клеток в это время происходит обратный сдвиг в сторону формирования двух и четырех автоспор (см. таблицу, столбец 5).

Далее, при  $1270 \cdot 10^9$  клеток/см<sup>3</sup>, суспензия была резко разбавлена свежей питательной средой до  $55 \cdot 10^6$  клеток/см<sup>3</sup>. Температура питательной среды была предварительно доведена до рабочей. Из опыта, таким образом, исключили возможность действия факторов пересева: измене-

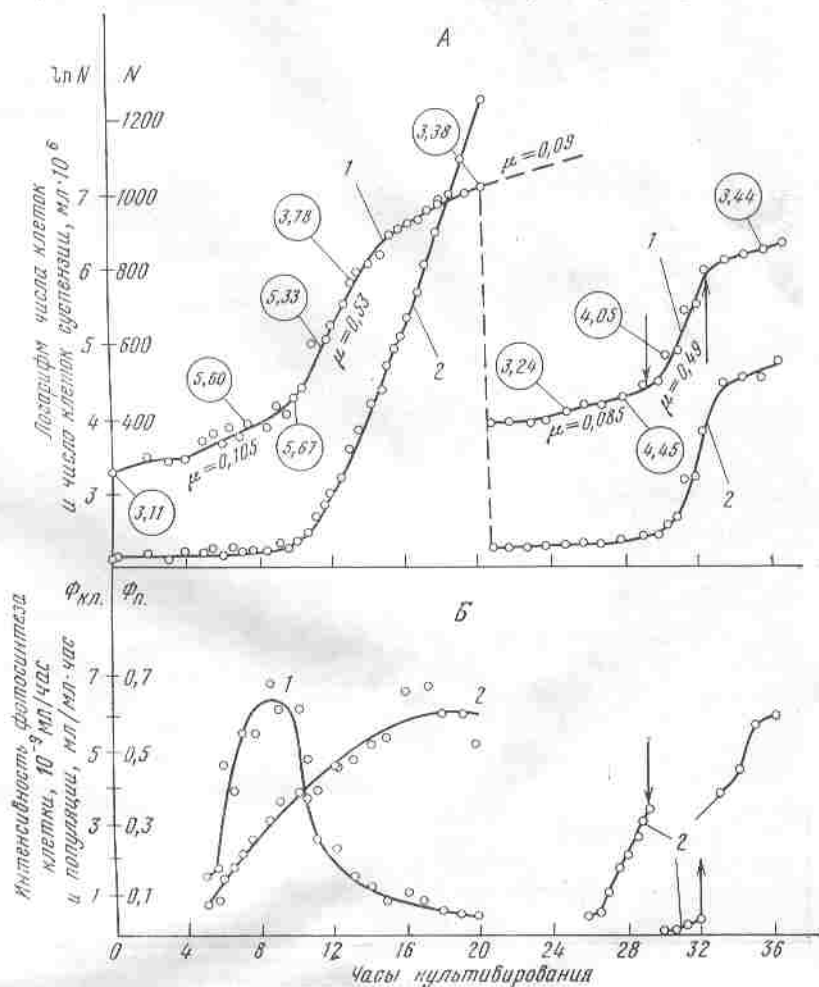


Рис. 2. Динамика изменения основных характеристик культуры *Chlorella* sp. K при интенсивном выращивании

А — рост числа клеток в полудогарифмическом (1) и линейном (2) масштабах, изменение удельного коэффициента размножения  $\mu$ . Цифры — средний размер клеток в мк; Б — динамика изменения фотосинтетической активности клетки (1) в мл СО<sub>2</sub>/час·10<sup>-9</sup> и суммарный фотосинтез суспензии (2) в мл СО<sub>2</sub>/мл·час. Стрелками на рисунке отмечены моменты уменьшения и увеличения интенсивности света

ние системы культивирования, температуры суспензии в момент пересева, качества света при переносе суспензии с люминесцентных ламп на ксеноновую и др. Однако рост числа клеток протекал с теми же особенностями, что и при обычном пересеве, включая появление лаг-фазы и отставание изменения коэффициента  $\mu$  от изменений условий культивирования.

Аналогичные явления с сохранением временных соотношений наблюдаются и при резком снижении облученности клеток (изменение интенсивности света отмечено на рис. 2 стрелками). Несмотря на более чем 10-кратное уменьшение света (с  $460 \cdot 10^3$  до  $40 \cdot 10^3$  эрг/см<sup>2</sup>·сек), после

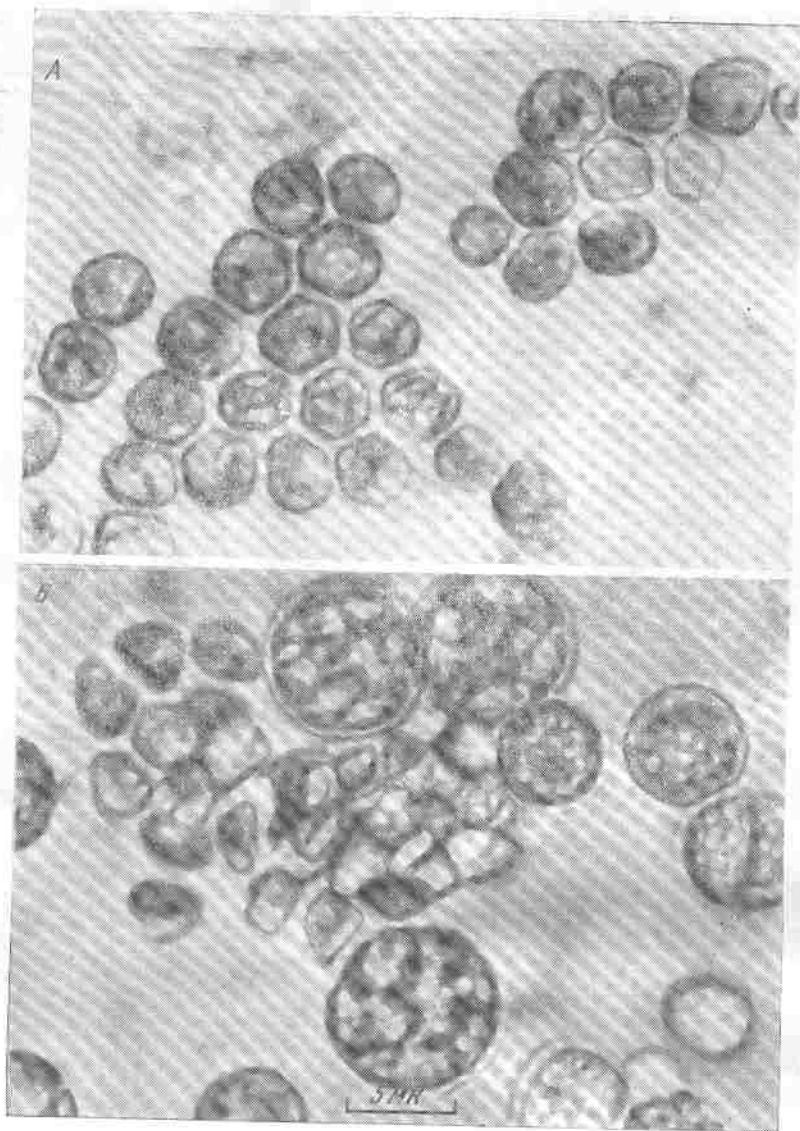


Рис. 3. Вид клеток культуры

Световой микроскоп, объектив  $\times 70$  с водной иммерсией, общее увеличение в 3200 раз. А — через 30 мин. от начала культивирования, Б — через 10 час. от начала культивирования

2-часовой переходной стадии скорость роста поднялась до величины  $\mu = 0,49 \text{ час}^{-1}$ , соответствующей условиям роста при высокой освещенности суспензии.

Проводившиеся в эксперименте измерения фотосинтетической активности свидетельствуют об относительно малой инерционности фотосинтетического аппарата клеток (см. рис. 2, Б), что ранее было показано в работах [12, 13] по изучению переходных процессов фотосинтеза в ответ на световое воздействие. После пересева культуры по окончании лаг-периода уровень фотосинтеза в расчете на клетку почти сразу достигает нормальной для новых условий величины —  $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ мл CO}_2/\text{час}$ . В результате высокой интенсивности фотосинтеза и малой скорости размножения происходит значительный рост среднего размера клеток в этот период. Дальнейший рост фотосинтетической активности

до  $6,5 \cdot 10^{-9}$  мл  $\text{CO}_2/\text{час}$  идет параллельно с ростом размера клеток и строго пропорционален увеличению объема клетки, т. е. увеличению фотосинтезирующей биомассы.

Возникающее затем световое ограничение, связанное с ростом оптической плотности суспензии, и увеличение скорости размножения приводят к уменьшению размеров клеток до нормы. Как следствие начинается уменьшение фотосинтетической активности в расчете на клетку. Суммарный фотосинтез популяции продолжает еще некоторое время увеличиваться за счет быстрого роста числа клеток и достигает своего максимума при плотности порядка  $700 \cdot 10^6$  клеток/см<sup>3</sup>.

Малой инерционностью фотосинтетического аппарата можно объяснить и аналогичное уменьшение среднего размера клеток при резком снижении освещенности во 2-й части эксперимента, когда скорость размножения продолжала оставаться высокой, несмотря на предельно низкую величину фотосинтеза суспензии.

Внешние признаки описанных явлений совпадают с эффектами, наблюдаемыми при частичной синхронизации, чем часто и объясняют замедленный вначале рост численности популяции и увеличение среднего размера клеток. Но подробное рассмотрение процесса показывает, что это не так. При синхронизации как начальное, так и последующее значения  $\mu$  могли бы принимать произвольные величины и зависели бы от степени синхронизации. Здесь же наблюдается строгая закономерность, при которой вначале  $\mu$  сохраняет величину, соответствующую прежнему режиму культивирования, а затем возрастает до величины, нормальной для новой облученности суспензии.

Точно так же можно легко отвергнуть и предположение о задержке деления клеток с уже образовавшимися автоспорами в результате светового воздействия с последующим развитием автоспор по жизненному циклу и делением внутри старой материнской оболочки. В этом случае максимум числа автоспор достигался бы не ранее чем через 10—12 час. от конца лаг-фазы, т. е. через время, равное длительности жизненного цикла. В действительности максимум числа автоспор на клетку отмечается через 6—8 час. от конца лаг-фазы. Другим доказательством, отвергающим обе указанные причины, может служить постоянство временных соотношений и хода процесса как при пересеве, разбавлении и прямом увеличении света, так и при снижении облученности.

Анализируя изложенное, можно заключить, что инерционность изменения коэффициента удельного размножения вызвана существованием в цикле развития клеток светонезависимой стадии, а время запаздывания равно длительности этой стадии. Полученный в эксперименте 2-часовой переход к новому значению  $\mu$  определяется, очевидно, таким же по длительности интервалом времени в жизненном цикле клетки, в течение которого интенсивность света оказывает решающее значение на число формирующихся автоспор. Исследования [8, 9], проведенные с использованием синхронной культуры, также говорят в пользу подобного заключения, хотя в них указанному периоду отводится более длительное время, равное всей 2-й половине стадии активного роста.

Из ряда работ [8, 9, 14—16], в которых изучалась динамика изменения содержания ДНК в клетках по жизненному циклу, вытекает связь между началом периода, в течение которого интенсивность света действует на число автоспор, и началом синтеза ДНК, отмечаемым обычно за несколько час. до светонезависимой стадии. Для выбранного нами штамма *Chlorella sp. K*, по литературным данным [14], синтез ДНК начинается на 5-м часу цикла развития, что совпадает с началом роста  $\mu$  в наших экспериментах.

Подробное рассмотрение особенностей динамики роста популяции микроводорослей и связь ростовых характеристик с жизненным циклом клетки приводят к заключению о необходимости учета перечисленных

выше явлений как в теоретических, так и в экспериментальных исследованиях. Получение стабильных характеристик культуры, таким образом, возможно лишь при использовании проточного культивирования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Цоглин Л. Н., Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Физиол. растений, 17, 1129, 1970.
2. Швытов И. А. Проблемы кибернетики, 15, 153, 1972.
3. Цоглин Л. Н., Владимирова М. Г. В сб.: Материалы VII Всесоюзного рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. «Наукова думка», Киев, 107, 1972.
4. Von Foerster H. In: The Kinetics of cellular Proliferation. Ed. F. Stohlman, 382, 1959.
5. Morimura I. Plant and Cell Physiol., 1, 49, 1959.
6. Senger H., Bishop N. I. Plant and Cell Physiol., 7, 441, 1966.
7. Tamiya H. In: Symposia of the Society for experimental Biologi. 188, 1963.
8. Wanka F. Planta, 79, 65, 1968.
9. Wanka F., Mulders P. F. M. Arch. Microbiol., 3, 257, 1967.
10. Семенов В. Е., Владимирова М. Г., Цоглин Л. Н., Таутс М. И., Филлиповский Ю. Н., Клячко-Гурвич Г. Л., Кузнецов Е. Д., Кованова Е. С., Райков Н. И. В сб.: Управляемый биосинтез, 75. «Наука», 1966.
11. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. «Наука», 1962.
12. Иванов Е. А., Александрова И. В. Проблемы космической биологии, III, 449. «Наука», 1964.
13. Цоглин Л. Н., Данилов В. Н., Семенов В. Е. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. II Всесоюзное совещание, 44. Красноярск, 1969.
14. Спекторов К. С., Никольская Т. В. Физиол. растений, 18, 754, 1971.
15. Stangel L., Kirk M., Bennet E. L., Calvin M. Biochim. et biophys. acta, 61, 681, 1962.
16. Kanazawa T., Kanazawa K., Kirk M. R., Basham J. A. Plant and Cell Physiol., 11, 149, 1970.

Поступила в редакцию  
23.VI.1972

#### EFFECT OF PECULIARITIES OF CELL LIFE CYCLE ON GROWTH OF MICROALGAL POPULATION

L. N. TZOGLIN, M. G. VLADIMIROVA

*K. A. Timiriachev Institute of Plant Physiology, USSR Academy of Sciences, Moscow*

Changes of the growth specific coefficient and growth rate of the number of the microalgal population lag behind changes of the cultivation conditions by a period equal to the duration of the light-independent phase of the cellular growth. Inertness of the growth characteristics is due to the fact that during the transition to new cultivation conditions all cells in the light-independent growth phase, going to divide, contain a definite number of the autospores corresponding to the previous light regime. There is a relatively short period of time in the life cycle of the microalgal cell during which the number of the autospores to be formed depend on the total light intensity. This period was found to be within the range of 2 hours for the strain used in the experiments. All growth dynamics of the population number depends on the peculiarities of the individual cycle of the microalgal growth.