

УДК 581.1

© 1992 г. А.Я.АКЫЕВ, Л.И.ЦОГЛИН

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА O_2 -ГАЗООБМЕН И НА РОСТ
БИОМАССЫ КЛЕТКИ В ЦИКЛЕ РАЗВИТИЯ *CHLORELLA**Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева
Российской Академии наук, Москва*

Изучали динамику выделения O_2 и прироста биомассы в онтогенезе клеток синхронной культуры *Chlorella sp.* К при продувке суспензии воздухом и CO_2 или азотом с тем же содержанием CO_2 . Скорость выделения кислорода в жизненном цикле клетки, рассчитанная на единицу биомассы, в обоих вариантах носила ступенчатый характер и имела максимум, который при 21% O_2 наблюдался через 4—6 ч от начала цикла, а в бескислородной газовой смеси смещался к концу цикла развития (7—8 ч). При этом в варианте с N_2 фотосинтетическое выделение кислорода проходило значительно интенсивнее и составляло в максимуме от 8 до 21 $мл \cdot мин^{-1} \cdot г^{-1}$ сухой массы (в различных опытах), в то время как в газозудушной смеси не превышало 5,5. Исключение кислорода из газовой смеси практически не отразилось на скорости и кинетике прироста биомассы клетки в цикле и на длительности цикла развития. Обсуждаются возможные причины рассогласования скоростей выделения кислорода и прироста биомассы клетки в варианте с N_2 .

Chlorella — клеточный цикл — выделение кислорода — состав газовой среды.

Интенсивное культивирование микроводорослей требует нахождения оптимальных условий их выращивания. Изучению влияния различных факторов культивирования на продуктивность микроводорослей посвящено много работ, направленных на поиск оптимальных соотношений таких параметров культивирования, как свет, концентрация углекислого газа, температура, коэффициент вентиляции, концентрация биогенных элементов в питательной среде [1, 2].

Однако при крупномасштабном производстве микроводорослей возникают новые проблемы. Одной из таких проблем можно считать накопление фотосинтетического O_2 в культуральной жидкости при ведении интенсивного культивирования не только в закрытых, но и в открытых фотобиореакторах [3].

Степень и характер действия факторов внешней среды (свет, температура, состав питательной среды, ингибиторы) зависят от того, на какой стадии развития находится клетка микроводорослей [4]. На этом основан ряд биотехнологических методов, применяемых для направленного синтеза заданных соединений.

Высокая концентрация O_2 ингибирует рост микроводорослей [5, 6]. В частности, угнетение скорости роста хлореллы происходит при парциальном давлении O_2 30% и выше [6].

Выделение кислорода в культуральную среду изучалось в работах [7—10]. Уста-

новлено, что фотосинтетическая активность клеток микроводорослей меняется в зависимости от их возраста. Поскольку эти изменения обусловлены различными структурными и функциональными перестройками фотосинтетического аппарата, можно ожидать, что растворенный в среде O_2 по-разному воздействует на клетки разного возраста. Учитывая применение методов управления возрастным составом культур, а также часто возникающую синхронизацию при культивировании с естественным освещением, изучение закономерностей действия кислорода на клетки разных возрастов может иметь и практическое значение.

Исходя из этого мы ставили целью настоящей работы изучение закономерностей роста клетки и фотосинтетического выделения O_2 в клеточном цикле (КЦ) в зависимости от состава газовой смеси (ГВС), подаваемой в синхронную культуру *Chlorella sp. K*.

МЕТОДИКА

Объектом исследования были одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella sp. K* (штамм получен из коллекции ИФР АН СССР — IPPAS). Микроводоросли выращивали по общеизвестной методике, описанной в работе [11], на половинной среде Тамия, приготовленной на дистиллированной воде. Синхронизацию проводили по методике, описанной в работе [7]. Культуру в течение 6—8 сут выращивали с использованием люминесцентных ламп типа БС-80 при двухстороннем слабом освещении ($35 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$), температуре 37° и 2% CO_2 . Культуру периодически разбавляли свежей средой так, чтобы число клеток находилось в пределах 250—300 млн $\cdot \text{мл}^{-1}$. Выращенную культуру переливали в сосуды емкостью 1 л, толщиной 2 см и освещали мощным светом с помощью лампы ДРИ-125 ($350 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$). Изменение интенсивности света на порядок вызывало перестройку в возрастном составе популяции [12]. Через 6—8 ч, когда численность взрослых и делящихся клеток достигала максимума, выключали свет. Далее свет и темноту чередовали с интервалом 7:5 ч до полной синхронизации культуры. Плотность суспензии в начале светового периода составила 0,1—0,3 г $\cdot \text{л}^{-1}$, разбавление проводили в темновой период свежей средой с температурой 37° .

Прирост сухой массы клеток определяли по оптической плотности на спектрофотометре *Spekol* фирмы "Carl Zeiss" (Германия) при длине волны 750 нм по калибровочному графику. Для калибровки использовали автоспоры и клетки, находящиеся в возрасте непосредственно перед делением. При низких плотностях культуры (до 0,35 г $\cdot \text{л}^{-1}$) калибровочные графики в обоих случаях совпадали, что дает возможность определить сухую массу клеток в течение всего КЦ по оптической плотности суспензии при 750 нм.

Подсчет числа клеток и распределение по размерам проводили на *Coulter Counter* фирмы "Coultronics" (Франция). Подсчет числа клеток осуществляли также в камере Горяева.

Для изучения динамики выделения кислорода использовали термостатируемую ячейку объемом 43 мл, в которую встроены кислородный электрод Кларка [13]. Культуру в ячейке барботировали ГВС с 2% CO_2 или с 2%-ной смесью CO_2 с азотом. Смеси приготавливали с помощью перистальтических насосов. Перемешивание культуры осуществляли с помощью магнитной и механической мешалок, встроены в ячейку. Суспензию освещали диапроектором ЛЭТИ-60М (интенсивность света — 44 $\text{Вт} \cdot \text{м}^{-2}$).

Динамику выделения кислорода и рост биомассы клетки в клеточном цикле хлореллы изучали при периодическом разбавлении и в условиях хемостатного проточного культивирования при скорости потока 0,25—0,27 ч $^{-1}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение клеток *Chlorella* по размерам (рис. 1) имело четкий максимум в каждый момент времени КЦ, и этот максимум перемещался во времени в сторону уменьшения размера клеток. Поскольку через 5 ч КЦ клетки начинали делиться, к 8 ч появлялся второй максимум в области, соответствующей размеру автоспор. О степени синхронности культуры можно судить по изменению числа клеток в КЦ (рис. 2—4, кривые 4).

Минимальный размер клеток (автоспоры) — около 2 мкм, максимальный (делящиеся клетки) около 7 мкм. Хотя размер клеток зависит от условий выращивания культуры, знание размера делящихся клеток в конкретных условиях важно для процедур по синхронизации.

Для изучения динамики выделения O_2 в КЦ синхронную культуру помещали в ячейку с начальной плотностью $0,15—0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ($20—40 \text{ млн} \cdot \text{мл}^{-1}$). Интенсивность света — $440 \text{ Вт} \cdot \text{м}^{-2}$ (ФАР). Суспензию барботировали ГВС с 2% CO_2 . Выделение O_2 регистрировали непрерывно, разбавление суспензии проводили через каждый час. Оптическая плотность культуры, измеренная при 750 нм, находилась в пределах $0,16—0,24$.

Полученные результаты приведены на рис. 2. Число клеток, в опыте оставаясь постоянным в течение 5 ч (кривая 4), к концу КЦ увеличилось в 8 раз. В то же время сухая масса клеток возросла в 16 раз (кривая 2). Это, очевидно, объясняется тем, что в процессе синхронизации клетки делились на 16 автоспор, а в измерительной ячейке на 8 автоспор. Скорость выделения O_2 культурой ступенчато увеличивалась в течение всего КЦ (кривая 1). Удельная скорость выделения O_2 , рассчитанная на единицу биомассы, имела максимумы около 4 и 6 ч КЦ. Это подтверждает полученные ранее данные, где показано, что удельная скорость выделения O_2 по КЦ микроводорослей носит неравномерный характер [4, 7, 8, 10]. В точке максимума удельная скорость выделения O_2 составляла $4,6 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$.

Результаты, полученные при проточном режиме культивирования, представлены на рис. 3. Как видно из сравнения рис. 2 и 3, характер кривых различается несущественно. Максимум удельной скорости выделения O_2 приходился на 6 ч КЦ и составлял от $3,3$ до $5,5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$ в разных экспериментах. На рис. 4 приведены результаты, полученные при барботировании культуры бескислородной смесью азота и углекислого газа. Содержание в суспензии растворенного O_2 , появляющегося за счет фотосинтеза клеток, изменялось от 1,7% в начале до 2,5% в конце КЦ. В бескислородной смеси скорость выделения O_2 также имеет максимумы, но они смещены к концу световой стадии КЦ. Причем скорость выделения O_2 в максимуме была значительно выше, чем при барботировании ГВС, и в разных опытах находилась в пределах от 8 до $21 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$, что значительно превышает удельную скорость выделения кислорода в расчете на единицу биомассы при барботировании ГВС (рис. 5). Особый интерес представляет сравнение по вариантам процессов выделения кислорода и прирост биомассы клетки в КЦ. Существенное увеличение удельной скорости выделения O_2 в бескислородной газовой смеси практически не отразилось на характере и скорости роста биомассы клетки (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс развития клетки микроводорослей в КЦ условно можно разделить на три этапа [10]: усиленное формирование хлоропласта и фотосинтетического аппарата — первая половина световой стадии КЦ; переключение метаболизма на накопление запасных веществ в клетке — вторая половина световой стадии; последовательная многократная (в зависимости от числа образующихся автоспор) репликация хлоропластной и ядерной ДНК, деление ядра, хлоропласта и клетки — конец световой и

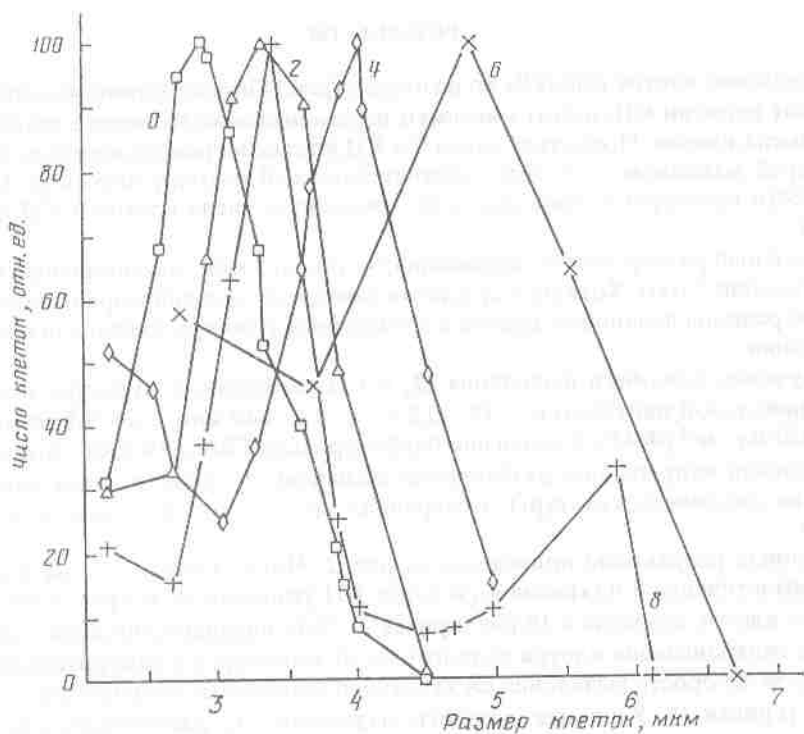


Рис. 1. Распределение клеток по размерам в онтогенезе синхронной культуры *Chlorella sp. K*.

Цифры на кривых — время от начала клеточного цикла, ч

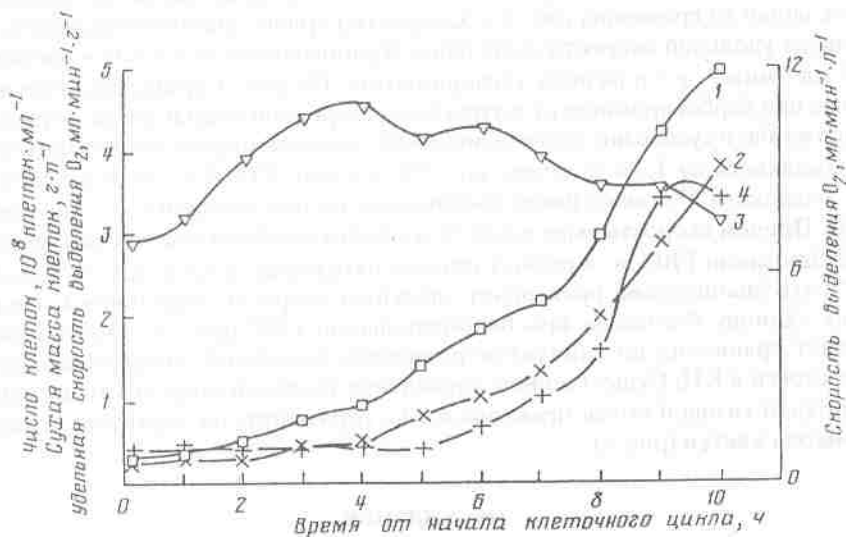


Рис. 2. Динамика изменения параметров синхронной культуры *Chlorella sp. K* в клеточном цикле

Продукта — 2% CO_2 и воздуха. Разбавление через каждый час

1 — скорость выделения O_2 , 2 — рост сухой массы клеток, 3 — удельная скорость выделения O_2 , 4 — число клеток

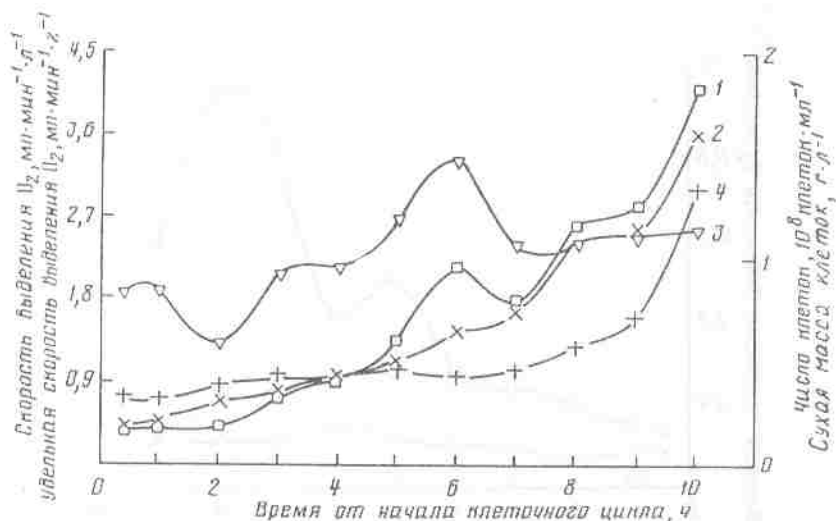


Рис. 3. Динамика изменения параметров синхронной культуры *Chlorella* sp. К в клеточном цикле

Продукта — 2% CO_2 в воздухе. Проточный режим.

1—4 — то же, что на рис. 2

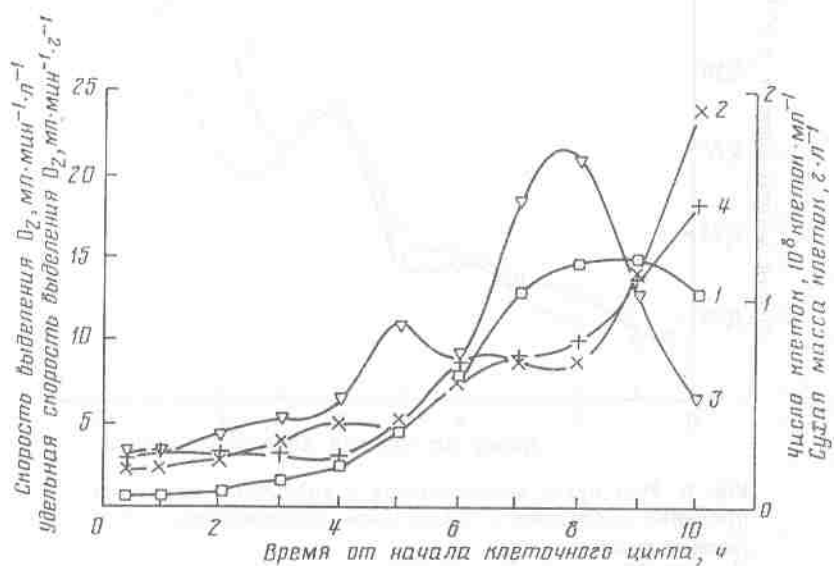


Рис. 4. Динамика изменения параметров синхронной культуры *Chlorella* sp. К в клеточном цикле

Продукта — 2% смесь CO_2 и азота. Проточный режим.

1—4 — то же, что на рис. 2

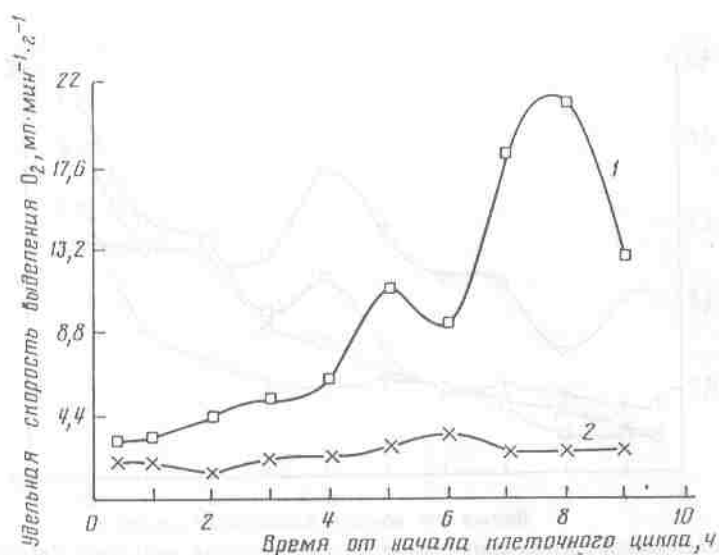


Рис. 5. Удельная скорость выделения O_2 в клеточном цикле при продувке суспензии с различным содержанием O_2 в газовой смеси

1 — 2% CO_2 в азоте, 2 — 2% CO_2 в воздухе

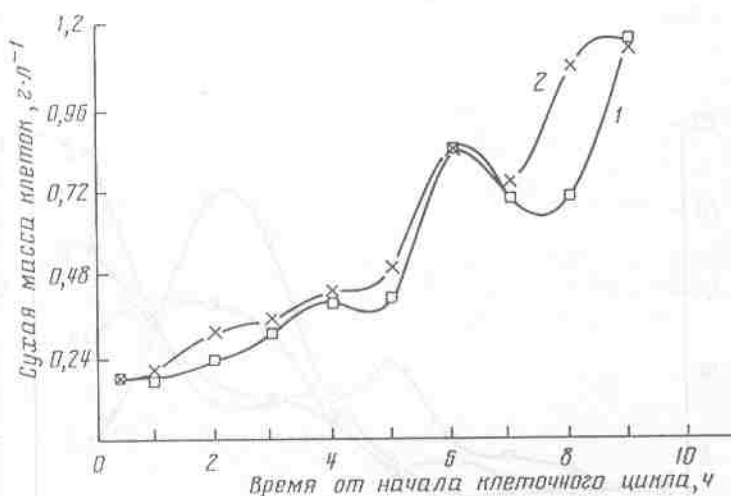


Рис. 6. Рост сухой массы клеток в клеточном цикле при продувке суспензии с различным содержанием CO_2 в газовой смеси

1 — 2% CO_2 в азоте, 2 — 2% CO_2 в воздухе

светонезависимая стадии развития. Функциональная активность хлоропласта и направленность метаболизма клетки при ее развитии определяются особенностями каждого из этапов. Как было показано в работе [4], при высоком уровне освещения в условиях барботирования суспензии ГВС с 2% CO_2 формирование хлоропласта сопровождается значительным ростом удельной скорости выделения кислорода (в расчете на единицу хлорофилла и на единицу биомассы) и ростом интенсивности света, насыщающей фотосинтез. При этом накопление элементов фотосинтетического

аппарата происходит в определенной последовательности — синтез реакционных центров фотосистем опережает синтез антенного хлорофилла [4]. Увеличение биомассы клетки в этот период идет медленно, что, по-видимому, свидетельствует о рассогласовании между процессами выделения кислорода и утилизации CO_2 . Эти события КЦ приводят к появлению хорошо выраженного максимума в кинетике удельной скорости выделения кислорода, который отмечается в первой половине световой стадии развития клетки. Пока нет достаточно четких объяснений разбалансирования в скоростях поглощения CO_2 и выделения O_2 , возможно, это связано с переработкой в начале цикла запасных веществ клетки, с разобщением работы фотосистем и возможностью самостоятельной работы фотосистем II в процессе формирования хлоропласта, или с совокупностью обеих причин.

Отличительными особенностями КЦ *Chlorella sp.* К в условиях бескислородной газовой смеси, как это видно из представленных данных, являются значительный рост удельной скорости выделения кислорода на протяжении всей световой стадии развития при одновременном отсутствии измерений в росте биомассы клетки по сравнению с циклом при продувке суспензии воздухом с 2% CO_2 и смещение максимума удельной скорости выделения кислорода к концу световой стадии.

В условиях барботирования бескислородной газовой смесью мы не имеем таких данных по КЦ, как динамика содержания хлорофиллов, реакционных центров фотосистем, световые кривые фотосинтеза на разных стадиях развития, накопление запасных веществ и др., которые необходимы для обоснованной интерпретации явлений.

В соответствии с эффектом Варбурга отсутствие O_2 в газовой смеси должно было стимулировать процессы выделения кислорода, поглощения CO_2 и прироста биомассы. Однако заметных различий в вариантах по приросту биомассы мы не наблюдали. Возможно, "бескислородные" условия инициировали выделение O_2 для обеспечения дыхания клетки. Концентрация в среде растворенного кислорода, появляющегося за счет фотосинтеза, составляла 1,7—2,5%. Учитывая высокую проницаемость мембран для кислорода, можно предположить, что внутриклеточная концентрация O_2 была также предельно низкой, что могло отразиться на окислительных процессах, на синтезе биомассы и затормозить переход клетки к накоплению запасных веществ во второй половине световой стадии КЦ. В свою очередь это создало условия для более длительного развития хлоропласта, аналогично формированию хлоропласта и фотосинтетического аппарата в начале КЦ при барботировании синхронной культуры ГВС

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семененко В.Е., Владимировна М.Г., Цоглиш Л.Н., Попова М.А. Зависимость роста продуктивности и ингенсивности фотосинтеза хлореллы от концентрации CO_2 в газовой смеси и коэффициента вентиляции культуры // Управляемый фотосинтез. М.: Наука, 1966. С.128.
2. Уштин В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. Рига: Зинатне, 1983. 239 с.
3. Цоглиш Л.Н., Семененко В.Е., Дилов Хр. и др. Изучение газообмена и оптимизация режима культивирования микроводорослей в открытых установках типа "Шетлик" // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 3. С.654.
4. Клячко-Гурвич Г.Л., Цоглиш Л.Н., Можайцева Г.И. Обмен липидов в ходе онтогенеза хлореллы в связи с активностью фотосинтетического аппарата // Физиология растений. 1981. Т. 28. Вып. 2. С. 421.
5. Кутюрин В.Л., Улубекова М.В., Назаров Н.М. Влияние света и кислорода на фотосинтез и дыхание водных растений // Физиология растений. 1964. Т. 11. Вып. 6. С. 965.
6. Amman E.G.B., Linch V.H. Gas exchange of algae. II. Effects of oxygen, helium, and argon on photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* // Applied microb. 1966. V. 14. № 4. P. 557.
7. Lorenzen H. Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender *Chlorella* bei langfristiger intermittierender Belichtung // Flora. 1959. V. 147. P. 382.

8. Sorokin G., Kraus R.W. Relative efficiency of photosynthesis in the course of cell development // Biochim. et biophys. acta. 1961. V. 48. P. 314.
9. Senger H., Bishop N. Changes in the photosynthetic apparatus during the synchronous life cycle of *Scenedesmus obliquus* // Prog. in photosyn. res. 1969. V. 1. P. 425.
10. Цоглин Л.Н., Клячко-Гурвич Г.Л. Изменение функциональной активности хлоропласта в клеточном цикле хлореллы // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 6. С. 1172.
11. Владимирова М.Г., Семенов В.Е. // Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 58 с.
12. Цоглин Л.Н., Владимирова М.Г. Влияние особенностей жизненного цикла клетки на рост популяций микроводорослей // Физиология растений. 1973. Т. 20. Вып. 5. С. 960.
13. Семенов В.Е., Цоглин Л.Н., Ситицкий И.Г. Установа для изучения $\text{CO}_2\text{-O}_2$ -газообмена микроводорослей // Материалы VII Всес. раб. совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наук. думка, 1972. С. 26.

Представлено Р.Г.Бутенко

Поступила в редакцию
17.IV.1991

A.Ja. AKYIEV, L.N.TSOGLIN

EFFECT OF OXYGEN ON O_2 GAS EXCHANGE AND CELL BIOMASS INCREASE DURING THE DEVELOPMENT CYCLE OF *CHLORELLA*

K.A.Timiriazev Institute of Plant Physiology of Russian Academy of Sciences, Moscow

The dynamics of O_2 evolution and biomass accumulation during the ontogenesis of *Chlorella sp.* K. synchronized culture was studied upon bubbling the suspension either with air containing CO_2 (2%) or with nitrogen containing the same concentration of CO_2 . The rate of oxygen evolution during the cell life cycle calculated per a biomass unit in both variants was of stepped character with a maximum which at the concentration of O_2 equal to 21% was observed within 4—6 h from the beginning of the cycle and in the gas mixture free of oxygen it was shifted to the end of the development cycle (7—8 h). In case of N_2 photosynthetic O_2 evolution was much more intensive and at the maximum reached from 8 to 21 ml \times min⁻¹ \times g⁻¹ of dry weight (in individual experiments) while in the CO_2 -air mixture it did not exceed 5,5. Exclusion of oxygen from the gas mixture practically did not affect the rate and kinetics of cell biomass accumulation during the life cycle and the duration of the development cycle. Possible reasons for the lack of coordination between oxygen evolution rates and the cell biomass accumulation in the variant with N_2 are discussed.