

УДК 581.1

О₂-ГАЗООБМЕН И НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ *CHLORELLA IPPAS C-1* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ О₂ В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ

© 1994 г. А. Я. Акыев, Л. Н. Цоглин

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

Поступила в редакцию 11.08.93 г.

Изучали закономерности О₂-газообмена, динамику накопления биомассы клеток и изменение содержания хлорофиллов в клеточном цикле *Chlorella sp. K* в зависимости от содержания растворенного О₂ в культуральной среде при насыщающей концентрации СО₂ (2 об. %). Низкая концентрация О₂ (рО₂ 3 - 7%) повышала удельную скорость выделения О₂ (в расчете на сухую массу клеток) по сравнению с контролем (рО₂ 21 - 24%), но практически не влияла на накопление биомассы и длительность клеточного цикла. Действие высокой концентрации О₂ (рО₂ 60 - 73%) особенно сильно проявлялось в начале клеточного цикла, снижая удельную скорость выделения кислорода при пониженных интенсивностях света. При интенсивности света, насыщающей фотосинтез, удельная скорость выделения О₂ мало отличалась от контроля. В то же время высокое содержание О₂ в среде приводило к затягиванию клеточного цикла и уменьшению скорости накопления хлорофиллов и биомассы клеток.

Chlorella – клеточный цикл – О₂-газообмен – кислород – хлорофилл – биомасса.

Влияние О₂ на фотосинтетический газообмен и продуктивность микроводорослей рассмотрено в ряде работ [1 - 3]. Показано, что высокое содержание О₂ в среде ингибирует рост микроводорослей [1] и увеличивает фотосинтетический коэффициент СО₂/О₂ [2]. Действие О₂ на фотосинтез *Chlorella* (поглощение ¹⁴СО₂ и выделение кислорода) зависит от энергетических параметров ассимилирующей клетки [3], изменяющихся при различных интенсивностях света или при введении экзогенного АТФ.

На состоявшемся в 1992 г. I Европейском рабочем совещании по биотехнологии микроводорослей (альгология) проблеме отрицательного действия высоких концентраций растворенного в суспензии О₂, накапливающегося в процессе интенсивного массового культивирования, было уделено много внимания [4 - 6]. Представленные сообщения позволяют заключить, что эта проблема является общей для разных типов фотореакторов и разных культур одноклеточных водорослей.

В ходе жизненного цикла происходит существенное изменение фотосинтетической активности и метаболизма клетки микроводорослей [7 - 11]. Поэтому естественно ожидать неодинакового влияния кислорода на клетки, находящиеся на разных стадиях развития.

Целью настоящей работы было изучение действия различной концентрации кислорода на за-

кономерности фотосинтетического выделения кислорода, накопления сухой массы клеток и динамику изменения хлорофиллов *a* и *b* в клеточном цикле микроводоросли *Chlorella*.

МЕТОДИКА

Объектом исследования были одноклеточные зеленые водоросли *Chlorella sp. K* (штамм из коллекции ИФР РАН - IPPAS C-1). Микроводоросли выращивали по методике, описанной в работе [12], на половинной среде Тамия, приготовленной на дистиллированной воде. Синхронизацию проводили по методу, описанному в работе [8] в культуральном сосуде (объем 700 мл, толщина 2 см). Суспензию освещали лампой ДНаТ-400-5. Интенсивность света на поверхности сосуда составляла 350 Вт/м², что обеспечивало нелимитируемые светом условия роста клеток в культуре.

Плотность суспензии в начале светового периода составляла 0.03 - 0.04 г сухой массы/л. Прирост сухой массы клеток и число клеток определяли как описано в работе [13].

Измерение О₂-газообмена культуры в течение клеточного цикла проводили в измерительной ячейке [14] с встроенным датчиком кислорода типа Кларка. Интервал времени, необходимый для достижения 95%-ного максимального сигнала при перенесении датчика из раствора, насыщенного воздухом, в раствор, не содержащий кислород (T_{95} , [15]), составлял менее 25 с. T_{95} системы (ячейка с встроенным кислородным датчиком, кислородомер, самописец) – менее 35 с. В опытах использовали три варианта: 1) культуру в

Сокращение: КЦ – клеточный цикл.

Адрес для корреспонденции: Цоглин Лев Наумович, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, Институт физиологии растений РАН.

измерительной ячейке и в опытном сосуде барботировали газовой смесью (2% CO_2 + воздух) — контроль; 2) то же, бескислородной смесью (2% CO_2 + азот), 3) то же, смесью с повышенным содержанием O_2 (2% CO_2 + 60 - 70% O_2 + азот). Смеси приготавливали с помощью перистальтических насосов и микрокомпрессора.

Суспензию в ячейке перемешивали магнитной и механической мешалками, встроенными в ячейку и освещали диапроектором ЛЭТИ-60М (максимальная интенсивность света на поверхности ячейки составляла 440 Вт/м² ФАР). Для снятия световых кривых фотосинтеза использовали нейтральные фильтры, которые находились между ячейкой и осветителем. Интенсивность света на поверхности сосуда при снятии световых кривых составляла 9, 24, 58, 111, 202, 335, 440 Вт/м².

Пробы объемом 80 - 100 мл отбирали из опытного сосуда перед включением света (т.е. в начале КЦ); затем через 2 ч после включения света и далее с 1.5 ч интервалом до конца КЦ. Для измерений суспензию при выключенном источнике света переливали в измерительную ячейку. Продувку в момент переливания отключали. Через 5 - 7 мин ячейку герметично закрывали и по уменьшению содержания O_2 в суспензии измеряли темновое дыхание. Затем включали продувку газовой смесью. После того как в ячейке установилась равновесная концентрация растворенного в суспензии O_2 (следили по записи на самописце), включали свет и снимали световые кривые фотосинтеза. В конце этой процедуры отключали продувку газовой смесью, ячейку герметично закрывали, и при интенсивности света 440 Вт/м² в течение 2 - 3 мин измеряли количество накапливающегося O_2 в ячейке (наклон полученной кривой использовали для расчета скорости выделения или поглощения O_2). Затем, ничего не меняя, выключали свет и измеряли скорость уменьшения $p\text{O}_2$ в ячейке, считая, что начальный наклон кривой качественно отражает уровень поглощения кислорода на свету.

Хлорофиллы экстрагировали с горячим метанолом и расчеты проводили по формуле [16].

Все опыты повторяли трижды. На рисунках представлены результаты типичного эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Световые кривые фотосинтеза представлены на рис. 1. В третьем варианте у автоспор и "2-часовых" клеток (т.е. клеток, которые находились на свету 2 ч) световой компенсационный пункт лежал значительно выше (около 25 Вт/м²) (рис. 1в, вставка), чем компенсационные пункты клеток остальных возрастов и всех возрастов остальных вариантов (около 5 Вт/м²) (рис. 1а - 1в, вставки).

Известно, что уровень плато световых кривых при насыщающей интенсивности света характеризует эффективность темновых реакций фотосинтеза. Из рис. 2а - 2в видно, что плато световых кривых повышалось в течение клеточного цикла до 5 ч и затем падало. Исключением являлось понижение уровня световой кривой 2-часовых клеток 3-го варианта. Первоначальный наклон световых кривых, который характеризовал работу фотохимических реакций фотосинтеза для всех возрастов (за исключением автоспор и 2-часовых клеток 3-го варианта), в основном был идентичен (рис. 1а - 1в, вставки).

Изменение фотосинтетической активности клеток при интенсивности света 440 Вт/м² представлено на рис. 2. Пониженная концентрация O_2 в среде ($p\text{O}_2$ 4 - 7%) с начала КЦ вызывала усиление фотосинтетической активности клеток (рис. 2, кривая 2) по сравнению с обычными условиями ($p\text{O}_2$ 21 - 25%) (рис. 2, кривая 1). В то же время при высокой концентрации O_2 ($p\text{O}_2$ 60 - 73%) удельная скорость выделения кислорода мало отличалась от контроля (рис. 2, кривые 1, 3). Незначительное уменьшение удельной скорости выделения O_2 наблюдалось в первые 3 ч и после 6.5 ч КЦ (рис. 2, кривая 3). Во всех случаях максимум фотосинтетической активности приходился на 5 ч от начала КЦ.

Характер изменения темнового дыхания культур (рис. 2, кривые 4 - 6) практически не зависел от концентрации растворенного в среде O_2 . В 1-м и 2-м вариантах динамики темнового дыхания имели почти полное сходство (рис. 2, кривые 4, 5) с незначительным отклонением от варианта 3 (рис. 2, кривая 6). Эти результаты согласуются с данными работы [3], где показана независимость темнового дыхания от концентрации кислорода в среде (если содержание кислорода в среде не ниже 2%).

Существенное действие O_2 наблюдалось при измерениях поглощения O_2 непосредственно после выключения света (рис. 2, кривые 7 - 9). В контроле оно достигало своего максимума к 2 ч КЦ, увеличиваясь в 3 раза по сравнению с автоспорами, затем постепенно падало (рис. 2, кривая 7). В вариантах 2 и 3 процесс изменения этого параметра в КЦ носил синусоидальный характер с примерно часовым сдвигом по фазе между кривыми (рис. 2, кривые 8, 9). При этом скорость потребления кислорода клетками после выключения света при $p\text{O}_2$ 60 - 73% была значительно выше (после 4 ч КЦ), чем в 1 и 2 вариантах (рис. 2, кривая 9).

Наблюдаемые отличия от контроля фотосинтетического выделения O_2 при низком и высоком содержании O_2 в среде сопровождались, очевидно, изменениями в фотосинтетическом аппарате клеток в КЦ. Об этом свидетельствовала динамика накопления хлорофиллов *a* и *b* (рис. 3, кривые 1 - 3 и 4 - 6, соответственно) и изменение их

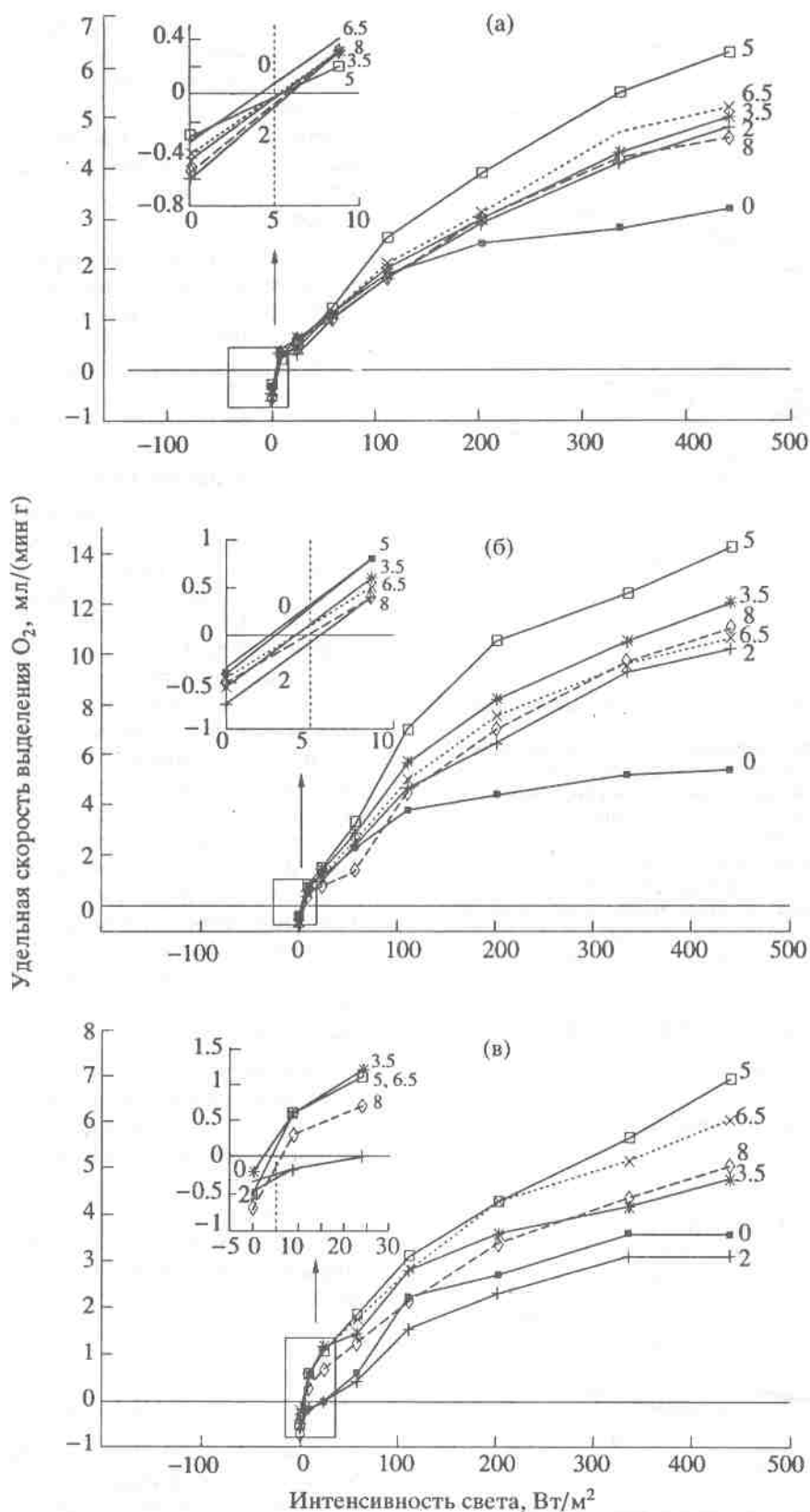


Рис. 1. Световые кривые фотосинтеза по выделению O₂ клетками разных возрастов синхронной культуры при пропускании суспензии газовой смесью с различным содержанием O₂.

Цифры на кривых – возраст клеток (время от начала клеточного цикла), ч. Вставка – световые кривые при низкой интенсивности света (увеличенный масштаб). (а) – 1-й вариант (2% CO₂ + воздух, pO₂ 21 - 24%); (б) – 2-й вариант – бескислородная газовая смесь (2% CO₂ + азот, pO₂ 3 - 7%); (в) – 3-й вариант – смесь с повышенным содержанием кислорода (2% CO₂ + 60 - 70% O₂ + азот, pO₂ 60 - 73%).

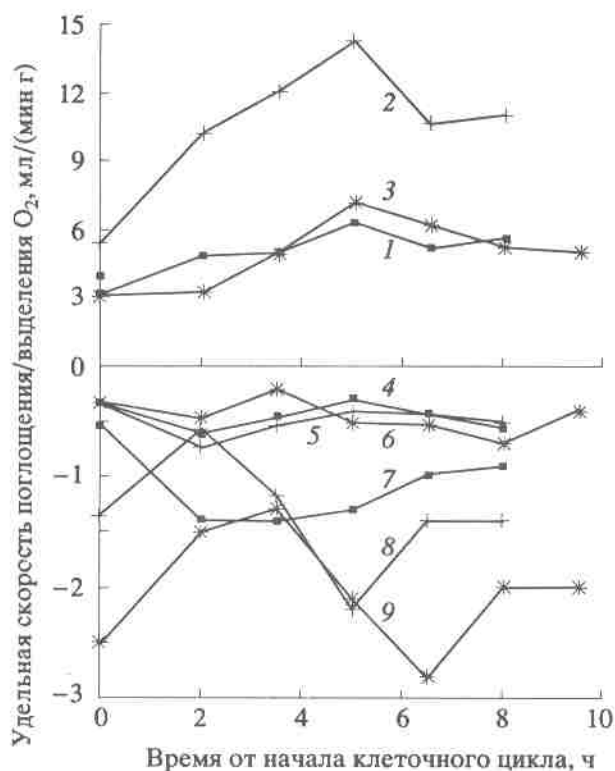


Рис. 2. Динамика удельной скорости выделения O_2 , поглощения O_2 непосредственно после выключения света и темнового дыхания клеток синхронной культуры при продувке суспензии газовой смесью с различным содержанием O_2 .

1 - 3 - удельная скорость выделения O_2 , 4 - 6 - удельная скорость темнового дыхания, 7 - 9 - удельная скорость поглощения O_2 после выключения света. 1, 4, 7 - 1-й вариант; 2, 5, 8 - 2-й вариант; 3, 6, 9 - 3-й вариант. Содержание O_2 в газовой смеси и pO_2 то же, что на рис. 1.



Рис. 3. Динамика изменения концентрации хлорофиллов a и b в клеточном цикле синхронной культуры при различной концентрации O_2 в среде.

1 - 3 - хлорофилл a , 4 - 6 - хлорофилл b , 7 - 9 - отношение хлорофилла a к хлорофиллу b (на вставке). 1, 4, 7 - 1-й вариант; 2, 5, 8 - 2-й вариант; 3, 6, 9 - 3-й вариант. Содержание O_2 в газовой смеси и pO_2 те же, что на рис. 1.

соотношения в течение КЦ (рис. 3, вставка). Скорость накопления хлорофиллов была наибольшей во 2-м варианте и снижалась с ростом pO_2 в вариантах 1 и 3. Уменьшение содержания хлорофилла a и увеличение содержания каротиноидов при высокой концентрации кислорода показано для синезеленой водоросли *Spirulina platensis* в работе [17].

Соотношение хлорофиллов a и b в разных вариантах показывают кривые 7 - 9 на рис. 3 (вставка). К 3.5 ч КЦ в вариантах 1 и 2 оно было максимально (5 и 7, соответственно), в то же время в варианте 3 оно достигало своего максимума (порядка 5) только к 5 ч КЦ. Видимо, это указывает на некоторую задержку формирования фотосинтетического аппарата при повышенной концентрации O_2 в культуральной среде.

Отражение вышеуказанных изменений фотосинтетического аппарата клеток и фотосинтетического O_2 -газообмена в конечном накоплении сухой биомассы клеток показано на рис. 4. В первые 2 ч КЦ накопление биомассы происходило одинаково во всех вариантах (рис. 4, кривые 1 - 3). Удельные скорости накопления биомассы также были близки (рис. 4, вставка). Во 2-м варианте максимум удельной скорости накопления биомассы находился около 5 ч КЦ, что совпадало с максимумом удельной скорости выделения O_2 . В 1-м и 3-м вариантах между 2 ч и 3.5 ч КЦ наблюдалось уменьшение удельной скорости роста сухой массы с последующим ее увеличением. Она была максимальна в 6.5 ч КЦ, в то же время максимум удельной скорости выделения O_2 наблюдался в 5 ч (рис. 4, вставка: рис. 2, кривые 2, 3). Такое разобщение между удельными скоростями выделения O_2 и накопления сухой массы отмечено и в работе [8].

Необходимо отметить, что рост сухой массы клеток в 3-м варианте после 2 ч КЦ шел медленнее, чем в 1-м и 2-м вариантах. Уровень удельной скорости роста сухой массы также был ниже, чем в контроле.

Спад удельной скорости роста в конце КЦ во всех вариантах можно объяснить массовым делением клеток, что видно из рис. 5. Из рис. 5 также видно, что в 3-м варианте клеточный цикл удлинялся.

ОБСУЖДЕНИЕ

В жизненном цикле клетка проходит несколько этапов: периоды синтеза необходимых для формирования фотосинтетического аппарата соединений, синтеза запасных веществ, подготовки клетки к делению и синтез веществ, необходимых для деления клеток [8].

Полученные данные показывают, что различные концентрации O_2 действовали на каждом из этих этапов не одинаково.

Закономерности O₂-газообмена в КЦ, обнаруженные ранее [7, 8, 10], сохранялись во всех вариантах (удельная скорость выделения O₂ носила ступенчатый характер и имела максимум).

Однако различия между ними обнаруживались при их количественном сравнении. При низкой pO₂ удельная скорость выделения O₂ была больше во всем КЦ по сравнению с контролем. Но в то же время по накоплению биомассы эти два варианта отличались мало.

Перевод клеток в условия с низким и высоким содержанием O₂ являлся "шоковым" (т.к. предварительная подготовка клеток, т.е. их синхронизация проводилась в обычных условиях – при продувке суспензии воздухом, содержащим 2% CO₂) и можно было ожидать изменения не только в фотосинтетическом O₂-газообмене, но также и изменения фотосинтетического метаболизма клеток. Возможно, одной из причин обнаруженного различия между вариантами 1 и 2 является изменение фотосинтетического метаболизма клеток, приводящее к синтезу более восстановленной сухой массы [2]. В наших опытах обнаружено повышение концентрации хлорофиллов *a* и *b*. По предварительным данным состав биомассы по содержанию белков и углеводов в вариантах 1 и 2 отличался незначительно, но не исключено его отличие по содержанию липидов.

Известно, что высокая концентрация O₂ должна привести к подавлению фотосинтеза [18, 19]. В нашем случае, как видно из световых кривых фотосинтеза (рис. 1в), при низкой интенсивности света действие O₂ (pO₂ 60 - 73%) проявлялось в начале КЦ (рис. 1в), но при насыщающей фотосинтез интенсивности света разница в удельной скорости выделения O₂ в вариантах 1 и 3 уменьшалась (рис. 1а, 1в и рис. 2, кривая 3). Видимо, молодые клетки более чувствительны к повышенной концентрации O₂ в среде. Об этом свидетельствует понижение удельной скорости выделения кислорода в начале КЦ в интервале от 0 до 3.5 ч (в 2 ч КЦ наблюдалось даже ее снижение по сравнению с начальной точкой) и в конце КЦ, когда в популяции появлялись дочерние клетки. В то же время в интервале КЦ от 3.5 до 6.5 КЦ удельная скорость выделения O₂ была сравнима или даже немного выше, чем в контрольном варианте. Таким образом, наши результаты согласуются с общепризнанным фактом, что повышенная концентрация O₂ ингибирует фотосинтетическое выделение O₂ [3], только лишь для определенных периодов КЦ. Тут очевидно нужно учитывать, что в работах по исследованию O₂- и CO₂-газообмена у хлореллы использовались равномерные культуры [2, 3].

Несмотря на сопоставимую фотосинтетическую активность, измеренную по выделению O₂, высокая концентрация O₂ приводила к затягиванию КЦ и замедлению накопления сухой массы клеток. Уменьшение скорости накопления био-



Рис. 4. Рост сухой массы клеток в клеточном цикле синхронной культуры в зависимости от содержания O₂ в среде.

На вставке – удельная скорость роста биомассы клеток, ч⁻¹ (значения получены по формуле $(P_2 - P_1)/P_2 \Delta t$, где P₁ – плотность суспензии в предыдущий момент времени, P₂ – плотность суспензии в настоящий момент времени, Δt – временной интервал между ними, ч).

1 – 1-й вариант, 2 – 2-й вариант, 3 – 3-й вариант. Содержание O₂ в газовой смеси и pO₂ те же, что на рис. 1.



Рис. 5. Динамика изменения числа клеток в клеточном цикле синхронной культуры в зависимости от содержания O₂ в культуральной среде. Обозначения те же, что на рис. 4.

массы клеток и удлинение КЦ можно объяснить следующими причинами: во-первых, по-видимому, задерживалось формирование фотосинтетического аппарата клеток, о чем свидетельствует динамика накопления хлорофиллов *a* и *b* и изменение их соотношения в течение клеточного

цикла, которое достигало своего максимума лишь к 5 ч КЦ (3.5 ч в вариантах 1 и 2). Конечное содержание пигментов в 3-м варианте также было ниже, чем в вариантах 1 и 2 (рис. 3. кривые 1 - 6). В пользу предположения о том, что задерживается формирование фотосинтетического аппарата клеток, свидетельствует также уменьшение удельной скорости выделения O_2 к 2 ч КЦ, когда в других вариантах происходило ее постепенное увеличение.

Во-вторых, возможно происходит потеря фиксированной CO_2 через гликолат в культуральную среду [19, 20]. Известно, что концентрация кислорода в среде действует на O_2 - и CO_2 -газообмен неодинаково. Это приводит к изменению фотосинтетического коэффициента при различных концентрациях кислорода в среде [2, 3]. Для более полного объяснения обнаруженного нами несоответствия между фотосинтетической активностью (измеренной по выделению кислорода) и накоплением биомассы клеток требуется изучение биохимического состава клеток и другой стороны газового обмена — CO_2 -газообмена.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать следующее заключение: 1) низкая концентрация O_2 в среде усиливает "видимое" выделение O_2 , но существенно не отражается на длительности КЦ и скорости накопления биомассы клеток *Chlorella*; 2) высокая концентрация O_2 существенно не влияет на "видимое" выделение O_2 , но приводит к замедлению накопления биомассы клетки и удлинению КЦ.

Последнее обстоятельство должно учитываться при массовом культивировании микроводорослей, особенно в тех случаях, когда для выращивания используется естественное освещение, т.к. при затягивании клеточного цикла клетки могут не успеть пройти световой период своего развития за дневное время.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amman E.G. B., Linch V.H. Gas Exchange of Algae. II. Effects of Oxygen, Helium, and Argon on Photosynthesis of *Chlorella pyrenoidosa* // Appl. Microb. 1966. V. 14. № 4. P. 557.
2. Fock H., Calvin D.T., Grant B.R. Effects of Oxygen and Carbon Dioxide on Photosynthetic O_2 Evolution and CO_2 Uptake in Sunflower and *Chlorella* // Photosynthetica. 1971. V. 5. № 4. P. 389.
3. Карабаев М.К., Глаголева Т.А., Зеленский О.В. Влияние кислорода на фотосинтез хлореллы // Ботан. журн. 1977. Т. 62. № 6. С. 802.
4. Tredici M.R., Zitelli G.C., Biagiolini S. Influence of Turbulence and Areal Density on the Productivity of *Spirulina platensis* Grown Outdoor in a Alveolar Panel // 1st European Workshop on Microalgal Biotechnology: Algology. Potsdam: Print express K. Beyer, 1992. P. 58.
5. Livansky K., Doucha J. An Estimation Method for CO_2 and O_2 Photosynthetic Rates and for CO_2 and O_2 Mass Transfer Coefficient of Desorption in Outdoor Algal Cultures // 1st European Workshop on Microalgal Biotechnology: Algology. Potsdam: Print express K. Beyer, 1992. P. 77.
6. Fournadzhieva S., Pilarsky P., Gabev A. Open Mass Algal Cultivation of Green Algae and Biomass Processing // 1st European Workshop on Microalgal Biotechnology: Algology. Potsdam: Print express K. Beyer, 1992. P. 93.
7. Senger H., Bishop N. Changes in the Photosynthetic Apparatus during the Synchronous Life Cycle of *Scenedesmus obliquus* // Progr. in Photosyn. Res. 1969. V. 1. P. 425.
8. Цоглин Л.Н., Клячко-Гурвич Г.Л. Изменение функциональной активности хлоропласта в клеточном цикле хлореллы // Физиология растений. 1980. Т. 27. Вып. 6. С. 1172.
9. Клячко-Гурвич Г.Л., Цоглин 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.
10. Lorenzen H. Die photosynthetische Sauerstoffproduktion wachsender *Chlorella* bei langfristiger intermittierender Belichtung // Flora. 1959. Bd. 147. H. 2. S. 31.
11. Sorokin C., Krauss R.W. Relative Efficiency of Photosynthesis in the Course of Cell Development // Biochim. Biophys. Acta. 1961. V. 48. № 2. P. 314.
12. Владимиров М.Г., Семенов В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М.: Изд-во АН СССР, 1962. 58 с.
13. Акьев А.Я., Цоглин Л.Н. Влияние кислорода на O_2 -газообмен и на рост биомассы клеток в цикле развития *Chlorella* // Физиология растений. 1992. Т. 39. Вып. 3. С. 495.
14. Семенов В.Е., Цоглин Л.Н., Синицкий И.Г. Установка для изучения CO_2 - O_2 -газообмена микроводорослей // Матер. VII Всесоюз. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наукова думка, 1972. С. 26.
15. Зеленский М.И. Полярографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. Л.: Наука, 1986. 140 с.
16. Hipkins M.F., Baker N.R. Spectroscopy // Photosynthesis Energy Transduction. A Practical Approach / Eds. Hipkins M. F., Baker N. R. Oxford, Washington: IRL Press Ltd, 1986. P. 51.
17. Мецзякова А.Л., Воронкова, С.С., Данилова Ю.Г. Влияние высоких концентраций кислорода на скорость роста и фотосинтез спирулины // Промышленное культивирование микроводорослей: Тез. докл. Всесоюз. конф. Ашхабад: ВНИИСЭНТИ, 1985. С. 33.
18. Cooms J., Whittingham C.P. The Effect of High Partial Pressures of Oxygen on Photosynthesis in *Chlorella*-I. The Effect on End Products of Photosynthesis // Phytochemistry. 1966. V. 5. № 4. P. 643.
19. Bassham J. A., Kirk M. The Effect of Oxygen on the Reduction of CO_2 and Other Products during Photosynthesis by *Chlorella* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1962. V. 9. № 5. P. 376.
20. Демидов Э.Д., Керимов С.Х., Бородин В.Б. Выделение гликолевой кислоты клетками хлореллы адаптированными к низким и высоким концентрациям CO_2 // IX Всесоюз. совещ. по вопросам круговорота веществ в замкнутых системах. Киев: Наукова думка, 1983. С. 40.

Представлено В.Е. Семенов