

УДК 581.132.1.036

К ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКЕ CHLORELLA SP. К ПРИ ВЫСОКИХ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

1. РАЗОБЩАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА КЛЕТОЧНЫЕ ФУНКЦИИ ХЛОРЕЛЛЫ

В. Е. СЕМЕНЕНКО, М. Г. ВЛАДИМИРОВА, О. Б. ОРЛЕАНСКАЯ

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

При изучении температурных (Т) и световых кривых роста культуры термофильной *Chlorella* sp. К с целью определения взаимодействия и оптимальных сочетаний этих факторов применительно к условиям интенсивной культуры нами было обнаружено [1], что при крайних высоких экстремальных температурах (ЭТ) (43—44°) в сочетании с определенной освещенностью в культуре появляются гигантские клетки, в 5—6 раз превышающие их размеры в норме. Было высказано предположение, что этот эффект определяется разобщением согласованного взаимодействия функций клетки, именно: блокированием процессов развития и деления при сохранении в течение определенного времени функциональной активности фотосинтетического аппарата и роста клетки. Предпосылкой к этому служат известные данные о различии Т оптимумов и границ для различных физиологических процессов у растений (роста и развития, бутонизации и цветения, дыхания и фотосинтеза [2—4]), а также данные Сорокина [5, 6], который нашел, что для процессов роста культуры и деления клеток хлореллы оптимальными и запретными являются более низкие Т, чем для фотосинтеза. Несовпадение Т оптимума роста и фотосинтеза для культуры мезофильного штамма хлореллы отмечено Далецкой и Чулановской [7]. Известны данные, показывающие различия Т оптимумов для процессов развития и роста клеток хлореллы [8—10]. Лоренцен [11] при изучении на синхронной культуре *Chlorella* воздействия Т и «низко- и высокотемпературных шоков» нашел различия Т границ для процессов роста, развития и деления клеток и обнаружил в цикле развития клеток фазы, чувствительные к ЭТ.

Все эти факты в принципе могут быть использованы для объяснения эффекта укрупнения клеток как результата разобщающего действия ЭТ на клеточные функции, различающиеся границами допустимых Т. В этом случае можно ожидать, что при блокировании развития и деления клеток (при одновременном сохранении функциональной активности фотосинтетического аппарата) в клетке будут накапливаться продукты фотосинтеза без дальнейшего их использования в метаболических процессах. Эффект разобщающего действия ЭТ на клеточные функции мог бы быть использован для изучения локализации продуктов фотосинтеза в органеллах клетки, химического состава этих продуктов, для управления биосинтезом *Chlorella* и получения биомассы с направленно измененным химическим составом [12]. Об изменении биосинтеза при ЭТ (43°) могут свидетельствовать опыты Владимировой и Ковановой [13], которые нашли снижение потребления азота клетками при 43°, по сравнению с

36°, что может указывать на блокирование белкового обмена в этих условиях.

Однако вполне мыслим и другой физиологический механизм, который может привести при высоких ЭТ к эффекту укрупнения клеток, именно механизм, в основе которого лежат осмотические явления. При ЭТ в клетке должны усиливаться гидролитические и дыхательные процессы с образованием низкомолекулярных воднорастворимых веществ (сахаров — в результате гидролиза крахмала¹ или органических кислот цикла Кребса). Возникновение в клетке низкомолекулярных веществ, как известно, приводит в результате эндосома к оводнению и сильному повышению осмотического давления (анатонозу), вызывая растяжение оболочки и увеличение клеток в размерах без дополнительного накопления в них веществ.

Таким образом, можно представить различные физиологические механизмы, действие которых приведет к укрупнению клеток при высоких ЭТ. Однако в одном случае без, в другом — с дополнительным накоплением продуктов. Можно допустить, что оба механизма имеют место.

О появлении в культурах *Chlorella* крупных клеток упоминается в работах ряда авторов [15—18]. Однако физиологического-биохимического анализа явления не проводилось. Вместе с тем исследование эффекта гипертрофированного укрупнения клеток при высоких ЭТ представляет интерес для изучения физиологии устойчивости хлореллы к экстремальным факторам. В связи с этим проведено изучение условий и динамики укрупнения клеток при ЭТ, а также сопровождающих это явление изменений морфологии и структуры клеток, дыхания, интенсивности и кинетики фотосинтеза. Данные биохимических и электронномикроскопических исследований рассматриваются в отдельном сообщении.

МЕТОДИКА

Опыты проводили на высокопродуктивном, термофильном, светолюбивом и фотостойчивом штамме *Chlorella* sp. K, детальная физиологическая характеристика которого дана в ряде сообщений [11, 19—24]. Как видно из Т кривой роста и продуктивности (рис. 1), этот штамм хорошо развивается в широком диапазоне Т от 26 до 41°. При дальнейшем повышении Т интенсивность роста ее резко снижается, и при 43° рост культуры составляет около 10% от роста при оптимальной Т. Поэтому в качестве ЭТ была использована Т=43—43,5°; контроль = 36°.

Культуру выращивали в стерильных условиях в стеклянных культуральных сосудах по описанной методике [25] на среде Тамия с нитратным азотом и тройной дозой железа [26] при круглосуточном освещении и барботировании суспензии воздухом с 1,5—1,8% CO₂. Освещение в предварительных опытах — люминесцентными лампами БС=30, в основных опытах — ксеноновой лампой ДКСТ-6000 (6 кет). Т на заданных уровнях стабилизировалась с точностью ±0,5°.

В ряде опытов использовали установку для управляемого проточного культивирования водорослей [22], в которой хлореллу выращивали в культиваторе с плоскопараллельными стенками с тонким слоем суспензии при одно- или двухстороннем освещении лампами ДКСТ-6000. При этом скорость роста и продуктивность водорослей в 8—10 раз выше, чем в культуральных сосудах.

Схема постановки отдельных опытов была различной. В одних — культуру подращивали при 36°, а затем часть культуральных сосудов оставляли при этой Т (контроль), а часть переносили на 43°. В других — выращивание проводилось, начиная от засева, при соответствующих температурах (36 и 43°). При проточном культивировании выращивание проводили при 36—38°, после чего Т повышали до 43°.

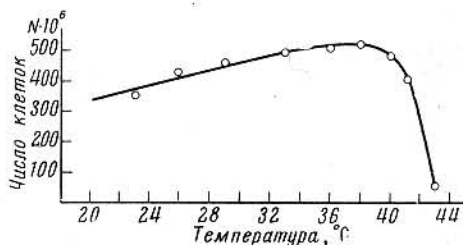


Рис. 1. Температурная кривая роста культуры *Chlorella* sp. K (по Владимировой и др. [1])

¹ Штамм *Chlorella* sp. K, как показала Клячко-Гурвич [14], отличается способностью к направленному биосинтезу и накоплению именно крахмала.

В процессе опытов учитывали и анализировали: Динамику роста культуры — методом счета числа клеток под микроскопом в камере Горяева и по оптической плотности суспензии на проградуированном фотокориметре ФЭК-М52.

Динамику укрупнения клеток и распределение их по размерам в суспензии — измерением диаметра клеток при помощи окулярмикрометра. В каждой из двух параллельных проб измеряли 100 клеток. Для построения кривой распределения клеток по размерам диапазон разбивали на группировки с интервалом 0,5 мк.

Число живых и мертвых клеток, их соотношение — по люминесценции клеток в ультрафиолете при помощи люминесцентного микроскопа МЛ-2.

Продуктивность культуры — по накоплению сухого вещества биомассы с доведением до постоянного веса при +85°.

Интенсивность фотосинтеза — путем непрерывного учета и регистрации поглощения CO₂ оптико-акустическим газоанализатором ОА-2209. Определяли также изменение концентрации CO₂ и O₂ в замкнутом контуре циркуляции воздуха с анализом газов на приборе Холдена, и по выделению O₂ — методом Винклера.

Интенсивность дыхания — на газоанализаторе ОА-2209 по выделению CO₂.

Микроскопические (морфологические) изменения клеток — на микроскопах МБИ-3 и МБИ-6 путем получения микрофотографий на микроскопе сравнения МС-51 и на микроскопе МБИ-6 и Zetopan (Reichert).

Субмикроскопическая структура клеток — путем получения электронно-микроскопических снимков на микроскопе УЕМ-5 (Япония) при фиксации клеток осмиевой кислотой и контрастировании уранилацетатом и свинцом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение условий и динамики укрупнения (роста) клеток при экстремальной температуре

Как видно из рис. 1, рост культуры использованного штамма по числу клеток при 43° подавлен почти на 90% по сравнению с 36°. Однако предварительные опыты с применением люминесцентных ламп ($I = 40 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$) показали очень незначительные (на 1 мк) сдвиги в размерных группировках клеток при 43°, несмотря на существенное торможение роста их числа.

Если увеличение размеров клеток при 43° определяется их ростом за счет сохраняющегося фотосинтеза, то можно предположить, что одним из лимитирующих факторов при использовании люминесцентных ламп являлась слабая освещенность клеток. По-видимому, для достижения значительного преобладания фотосинтетического накопления веществ над их тратами в усиливающемся с повышением T дыхании необходимы существенно большие освещенности.

В связи с этим было детально изучено влияние на эффект укрупнения клеток интенсивности освещения в широком диапазоне облученностей.

а) Зависимость эффекта укрупнения клеток при ЭТ от интенсивности света. Исследовано влияние на изучаемый эффект облученности в интервале от $35 \cdot 10^3$ до $600 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$. Диапазон интенсивностей света выбран, исходя из изученных ранее [1] световых кривых роста данного штамма при оптимальных T , которые показали, что в интенсивной культуре световое насыщение роста *Chlorella* sp. К наступает при $540 - 580 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$.

Как видно из табл. 1, при сравнительно низких интенсивностях света (до $100 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$), несмотря на T инактивацию роста культуры и деления клеток при 43°, увеличение размеров клеток, по сравнению с контролем (36°), не происходит. При повышении облученности сверх $150 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ в условиях 43° наблюдается резкое увеличение размеров клеток. Особенно отчетливо зависимость размеров клеток при 43° от интенсивности света видна из кривых рис. 2, которые отражают появление группировок клеток со все возрастающими размерами по мере повышения интенсивности света: чем выше интенсивность света, тем бо-

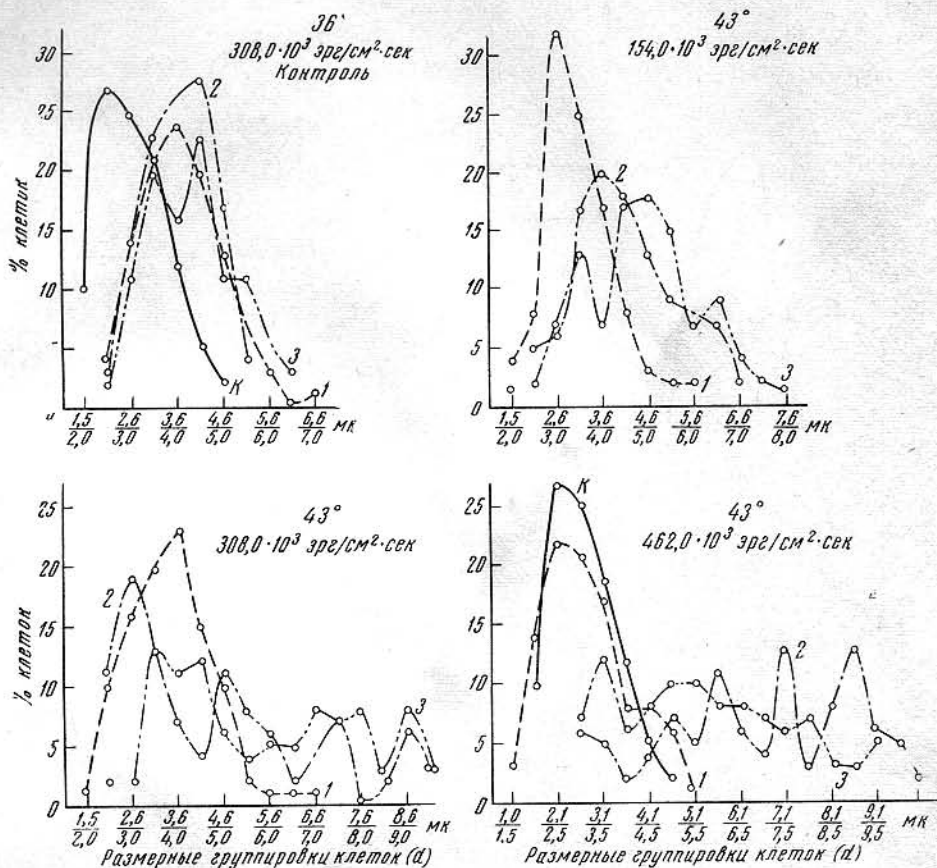


Рис. 2. Зависимость распределения клеток по размерам при экстремальной температуре от интенсивности света

Распределение клеток по размерам: К — в момент засева; 1 — на первые; 2 — вторые; 3 — третьи сутки

лее крупные клетки появляются и тем больше их относительное содержание в культуре.

б) Зависимость эффекта укрупнения клеток при ЭТ (43°) от плотности (засева) культуры. Наряду с интенсивностью падающего на суспензию света облученность клеток в популя-

Таблица 1

Характеристика роста и распределения по размерам клеток в зависимости от интенсивности света

Длительность культивирования, сутки	Вариант	Температура, °С	Интенсивность света, $\times 10^3$ эрг/см ² ·сек	Число клеток, млн/мл	Диапазон размеров клеток, мк	% крупных клеток*
3	Контроль	36	169,4	599	2,1—6,0	0
	Опыт	43	34,6	241	2,1—5,5	0
		43	88,5	271	2,1—6,0	0
3	Контроль	36	157,8	274	2,6—7,0	5
		43	308,0	527	2,1—6,5	0
	Опыт	36	308,0	227	2,6—1,5	36
		43	462,0	80	2,6—10,5	41

* «Крупными» считаются клетки больше по величине, чем максимальные по размерам клетки в контроле. «% крупных клеток» подсчитан как % клеток (от общего числа) с размерами, превышающими максимальные по величине клетки в контроле.

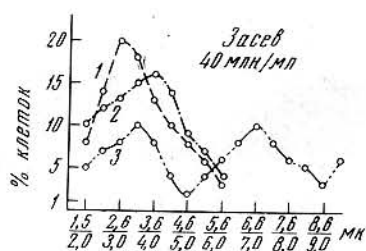
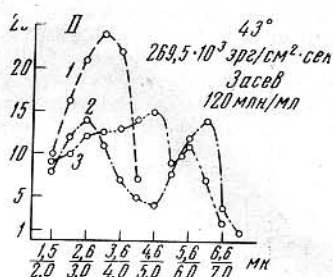
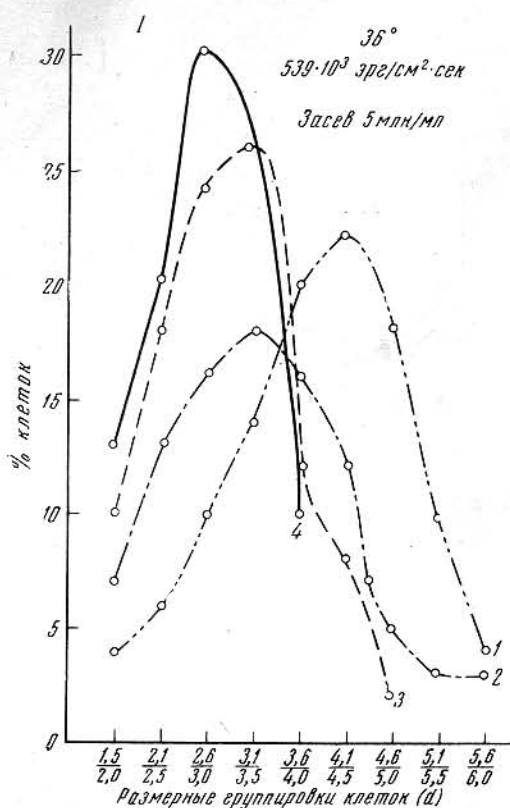


Рис. 3. Зависимость эффекта укрупнения клеток при экстремальной температуре от плотности суспензии при различных интенсивностях света

I — контроль; 1, 2, 3 — распределение размеров клеток соответственно на первые, вторые, третьи сутки; 4 — в момент засева; II—IV: 1, 2, 3, 4 — распределение размеров клеток соответственно на первые, вторые, третьи, четвертые сутки

ции зависит от плотности суспензии. Поэтому была изучена зависимость эффекта от плотности культуры. Результаты одного из опытов, представленные на рис. 3, показывают, что при ЭТ размеры клеток увеличиваются тем больше, чем меньше засев культуры, чем выше интенсивность света, и доходят при засеве $5 \cdot 10^6$ клеток/мл и освещенности $539 \cdot 10^3$ эрг/см²·сек до 13—14 мк против 3—5 мк в контроле.

Обратная зависимость эффекта укрупнения клеток от плотности засева, таким образом, также указывает на существенное значение облученности клетки в этом процессе.

в) Динамика роста размеров клеток при ЭТ. Как видно из рис. 4 и кривых рис. 3, эффект укрупнения клеток при ЭТ развивается во времени и достигает максимального значения на вторые—третьи сутки. Оптимизация условий культивирования приводит к сокращению этого времени. Когда водоросли культивировали при высокой напряженности всех факторов среды, отчетливое увеличение клеток при 43° отмечается уже через 8—16 час. (см. рис. 6, а). При этом в культуре уменьшается относительное количество клеток с обычными размерами (3—5 мк) и появляются и увеличиваются в количестве все более крупные клетки.

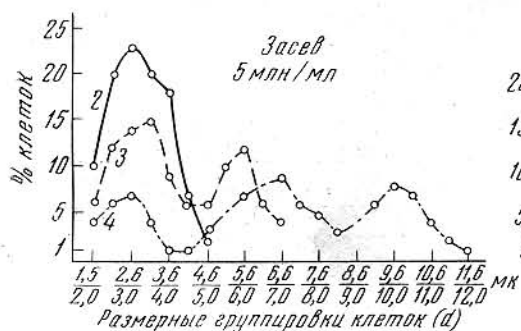
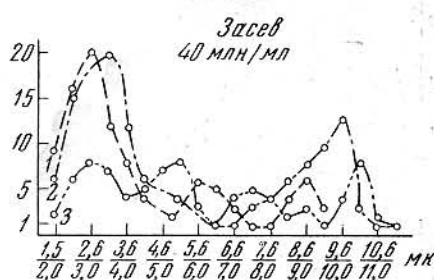
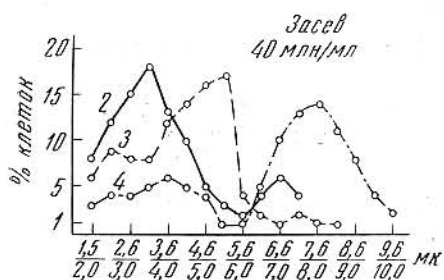
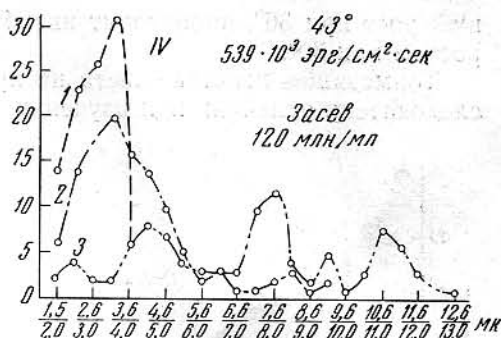
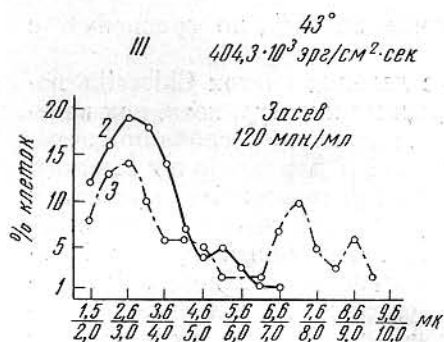


Рис. 3 (III, IV)

Фотоингибирование роста культуры (деления клеток) при ЭТ

Анализ полученных материалов показывает, что свет при ЭТ выступает не только как фактор, необходимый для фотосинтеза, но и приводит (на фоне ЭТ) к сильному ингибированию размножения клеток. Этот эффект фотоингибирования роста культуры при 43° хорошо виден из рис. 5.

На рис. 5, А представлены световые кривые роста культуры *Chlorella* sp. К по числу клеток при 36° и 43° . При этом кривые пересчитаны в относительные единицы так, что за 100% принят рост культуры при одинаковой освещенности ($115 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$) как для 36° , так и для 43° . Это позволило разделить действие на рост культуры Т и освещенности и вычлнить световую кривую фотоингибирования (рис. 5, Б), как зависимость от интенсивности света разницы в скорости роста культуры при 36° и 43° , когда действие Т нивелировано. Как видно из кривых рис. 5, световое насыщение роста культуры при 43° наступает при $150 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$, а при $500 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ — интенсивности света, близкой к насыщаю-

щей рост при 36°, происходит ингибирование на 75%, по сравнению с ростом при 36°.

Тормозящее действие света на процесс деления клеток *Chlorella* исследователи отмечали при изучении синхронных культур, хотя, как известно, хлорелла способна при оптимальной T длительно и с высоким темпом размножаться в условиях непрерывного интенсивного освещения. Описанный эффект фотоингибирования является, по-видимому, специфическим воздействием на клетку света в сочетании с влиянием на нее ЭТ.

Изменение морфологии и структуры клеток хлореллы при высокой экстремальной температуре

Изучение морфологии клеток под световым микроскопом показало, что при переходе к ЭТ происходит не только увеличение размеров клеток, что видно из микрофотографий на рис. 6, но и меняется их морфологическая картина.

Клетки, проекция которых обычно не имеет форму правильного круга, при 43° приобретали вид идеально круглого тела, создавая впечатление «раздуваемого» шара. В них появляется зернистость (мелкая и крупная), различающаяся по оптической плотности. При высоких освещенностях, кроме крупнозернистой структуры, наблюдается оттеснение хроматофора к стенке (рис. 7). По мере увеличения срока культивирования при 43° происходило постепенное пожелтение клеток и при высоких освещенностях к концу третьих — четвертых суток они почти полностью обесцвечивались.

Как видно из электронно-микроскопического снимка (рис. 8), полученного в конце 16-часового периода пребывания культуры при 43° и двусторонним интенсивным освещением ($500 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$) в установке для проточного культивирования [22], вся клетка заполнена крупными зернами, которые расположены между ламеллами хлоропласта и представляют по данным биохимического анализа крахмал.

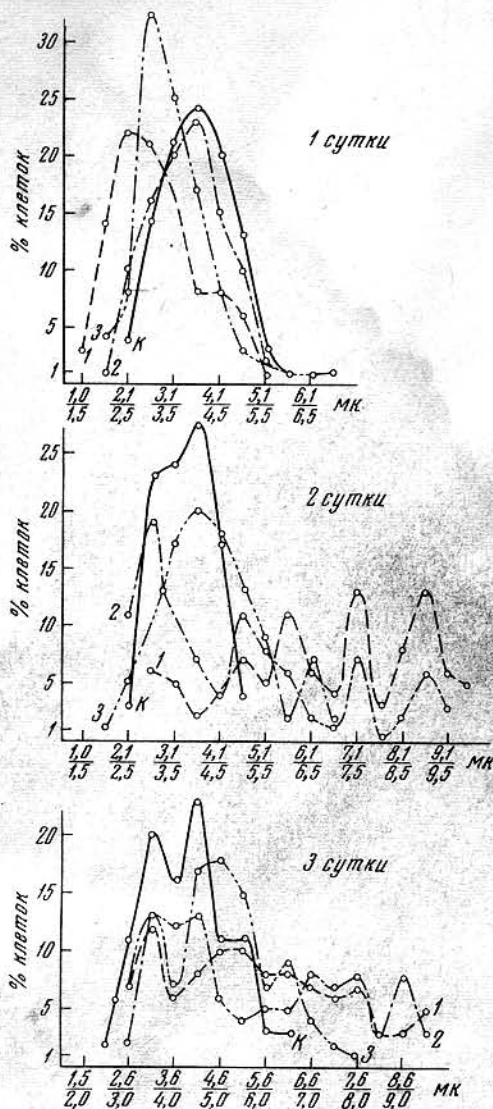


Рис. 4. Динамика укрупнения клеток *Chlorella* sp. К при экстремальной температуре

Сплошная линия (К) — распределение клеток в контроле 36°; 1 — $460 \cdot 10^3$; 2 — $300 \cdot 10^3$; 3 — $150 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$

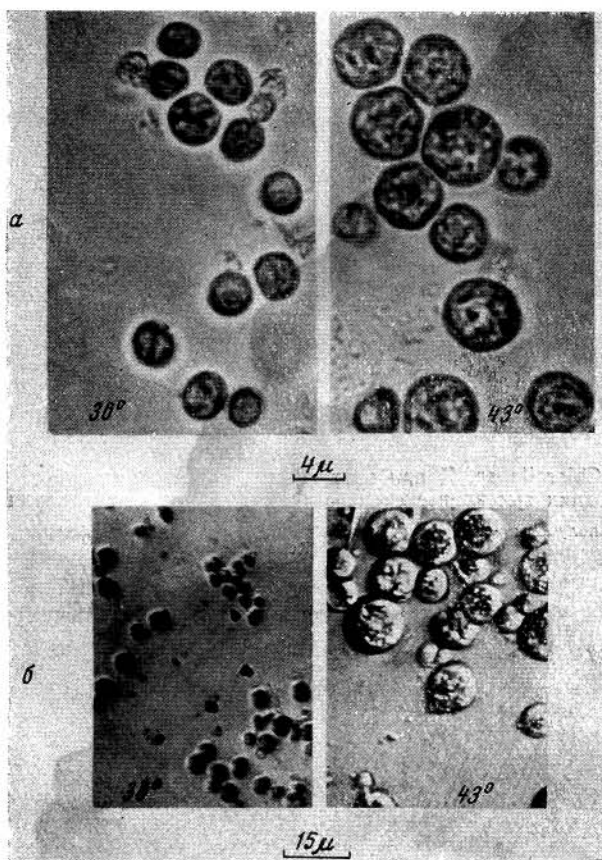


Рис. 6. Клетки *Chlorella* sp. К при оптимальной (36°) и экстремальной (43°) температурах

А — через одни сутки воздействия экстремальной температурой (МБИ-6); Б — через трое суток воздействия экстремальной температурой (микроскоп сравнения)

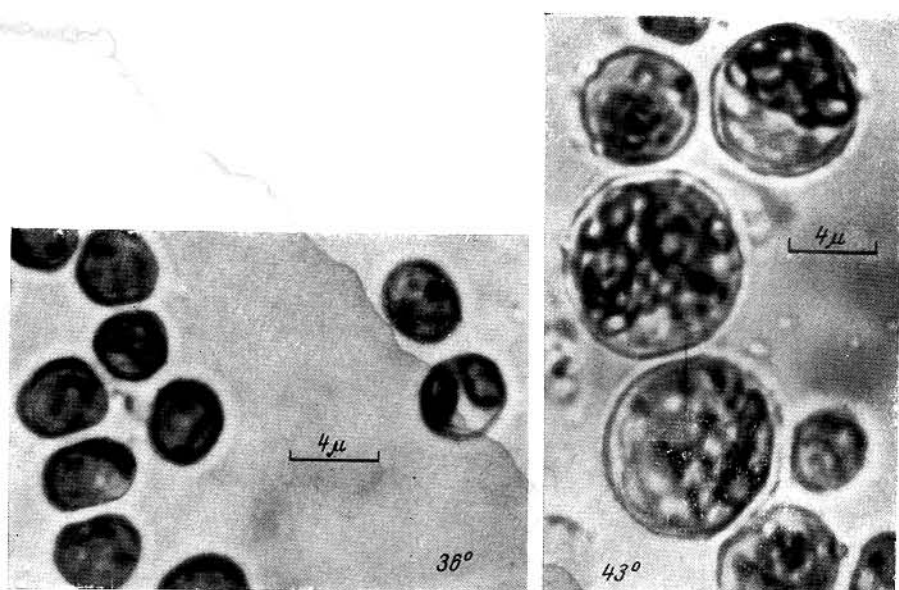


Рис. 7. Клетки *Chlorella* sp. К при оптимальной и экстремальной температурах в условиях высокоинтенсивного проточного культивирования
 Микрофотографии получены через 16 час. воздействия экстремальной температурой (микроскоп Zetopan (Reichert))

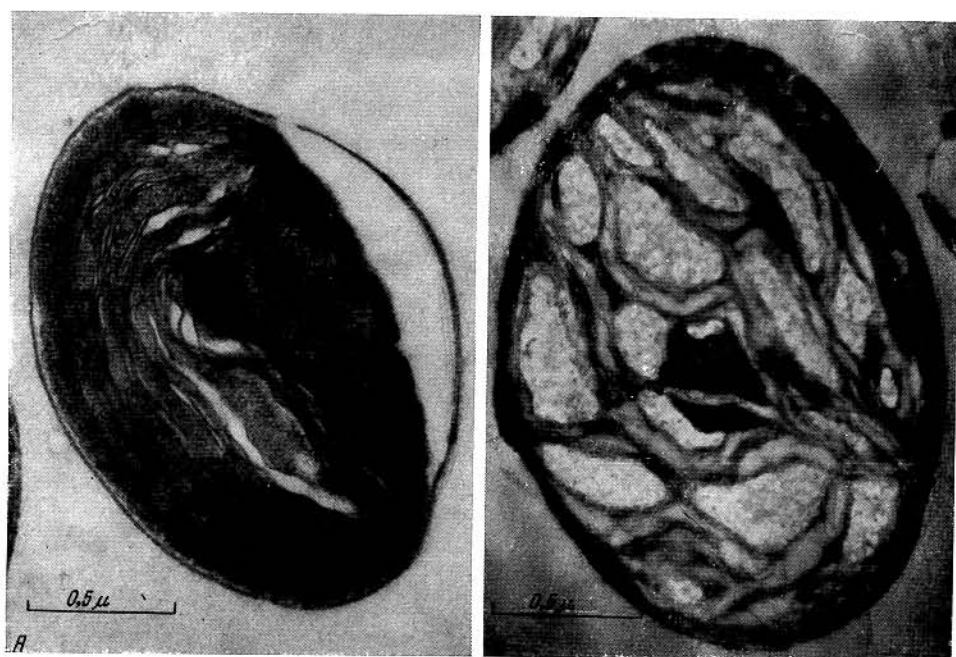


Рис. 8. Электронно-микроскопическая структура клетки *Chlorella* sp. К после 16-часового воздействия экстремальной температурой
 А — контрольный (36°); Б — опытный (43°) варианты

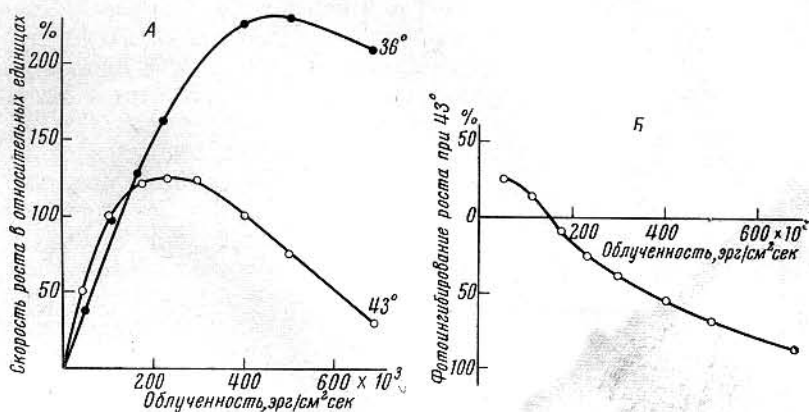


Рис. 5. Фотоингибирование роста культуры *Chlorella* sp. К при экстремальной температуре
 А — световые кривые роста (по увеличению числа клеток) культуры при 36° и 43°;
 Б — фотоингибирование роста числа клеток в культуре при 43°

Изучение взаимосвязи эффекта укрупнения клеток, роста и фотосинтетической продуктивности культуры *Chlorella* sp. К при экстремальной температуре

Очевидно, что накопление культурой при 43° органического вещества может указывать на сохранение функции фотосинтеза, а сравнение динамики роста числа клеток и накопления биомассы может показать, реализуются ли продукты фотосинтеза через увеличение числа клеток или посредством роста отдельных особей, т. е. насколько разобщаются (или согласованы) процессы развития и размножения клеток и их рост. Поскольку в клетках при 43° не наблюдается резко выраженной вакуолярности и в хроматофорах появляются крупные включения (зерна, рис. 8), можно думать, что клетки в этих условиях осуществляли фотосинтез и осмотические явления не играли главной роли в процессе их укрупнения. Подтверждение этого получено при измерениях соотношения числа клеток и накапливаемой биомассы при ЭТ.

Как видно из рис. 9, при 43° в культуре идет накопление органического вещества за счет роста отдельных клеток, вес которых к концу культивирования возрастает в несколько раз, по сравнению с контрольными. При этом вес отдельных клеток оказывается тем большим, чем выше интенсивность света и меньше засев, т. е. в условиях, когда наблюдается увеличение их размеров.

Разобщение клеточных функций при ЭТ отчетливо отражает рис. 10. Как видно из рис. 10, А, при 43° происходит увеличение оптической плотности культуры¹, хотя число клеток (рис. 10, Б) оставалось без изменения. Увеличение оптической плотности популяции происходило в результате прироста биомассы (рис. 10, В) за счет роста отдельных особей, вес которых к концу опыта возрос почти в 8 раз (рис. 10, Г), свидетельствуя о блокировке размножения клеток при сохранившейся их фотосинтетической активности. Об этом же говорят световые кривые (рис. 11), из которых видно, что, несмотря на фотоингибирование размножения (рис. 11, А), с повышением облученности возрастает продуктивность культуры (рис. 11, Б), и это сопровождается увеличением веса клеток (рис. 11, В).

Таким образом, опыты однозначно показывают, что увеличение размеров клеток при ЭТ определяется не осмотическими явлениями, а на-

¹ Значения даны в относительных величинах, полученных путем перемножения оптической плотности (D) для зеленой области спектра на разведение суспензии.

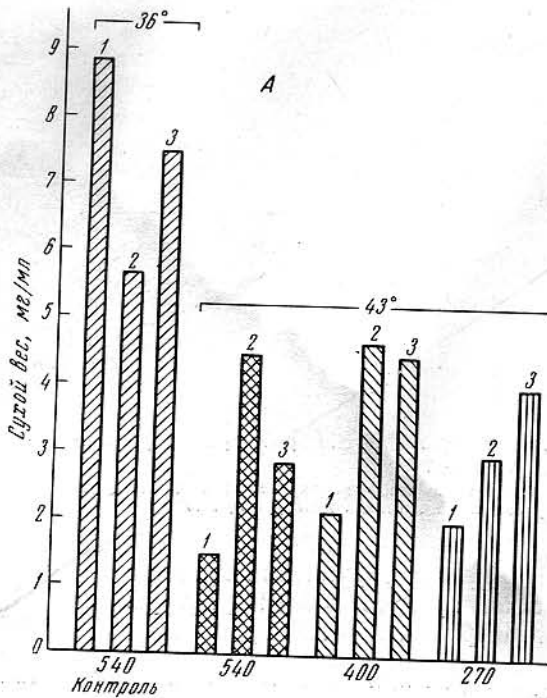


Рис. 9. Сравнительная характеристика суммарной продуктивности культур по накоплению сухого вещества (А) и веса отдельных клеток (Б) при 36 и 43° при различных интенсивностях света и величинах засева

1, 2, 3 — плотности засева культур, соответственно 5, 40 и 120 · 10⁶ клеток/мл. Цифры под колонками обозначают интенсивность света в тыс. эрг/см² · ссек

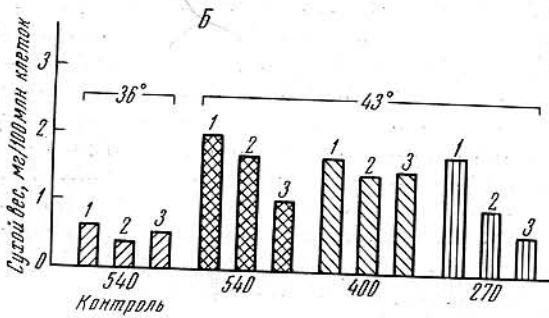
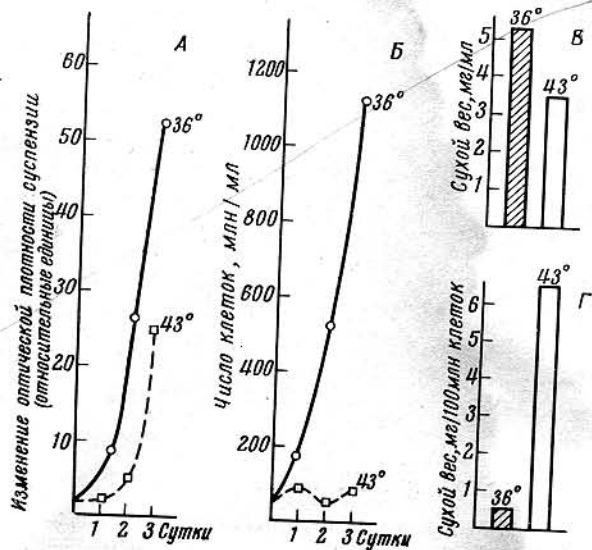


Рис. 10. Сравнительная характеристика изменений оптической плотности (А), роста числа клеток (Б), фотосинтетической продуктивности по накоплению сухого вещества (В) и веса отдельных клеток (Г) при оптимальной и экстремальной температурах



Только
330

коплением органического вещества, несмотря на блокировку нормально-го цикла развития клетки, т. е. разобщением согласованного взаимодей-ствия функции фотосинтеза и размножения клеток.

Вместе с тем (рис. 9, 10) суммарное накопление биомассы к концу трех суток культивирования оказывается меньшим при 43°, чем при 36°. Это может свидетельствовать о подавлении фотосинтеза непосредственно ЭТ. Однако снижение суммарной фотосинте-тической продуктивности может быть вторичным и обуслов-ливаться торможением фото-синтеза накапливаемыми асси-милатами.

Повышение Т может про-водить к непроизводительным энергетическим и материаль-ным затратам на единицу на-капливаемой биомассы из-за активации дыхания. Поэтому представляло интерес, изучить

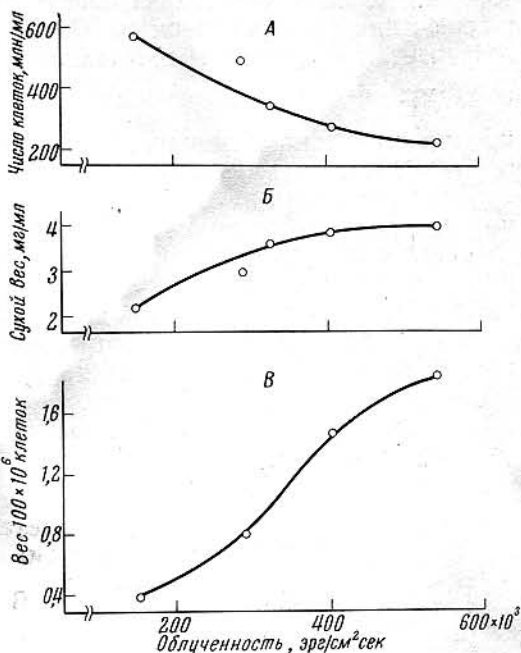


Рис. 11. Зависимость от интенсивности света роста (А), продуктивности (Б) и веса отдельных клеток (В) культуры *Chlorella sp. K* при 43°

изменение интенсивности дыхания при ЭТ, в сравнении с оптимальной, и соотношение интенсивностей дыхания и фотосинтеза, а также кинетику фотосинтеза при переходе от оптимальной Т к ЭТ.

Сравнительное изучение интенсивности дыхания культуры *Chlorella sp. K* при 36 и 43° и соотношение его с интенсивностью фотосинтеза

Измерение темнового дыхания культуры в условиях интенсивного проточного выращивания показало (табл. 2), что при 43° дыхание увеличивается вдвое, по сравнению с таковым при 36—38°.

Если при 36° интенсивность дыхания составляла 5% от фотосинтеза при этой же Т и насыщающей интенсивности света, то при 43° — 10%. По мере увеличения времени действия 43° это отношение возрастает, и через 36 час. оно составило почти 40% от интенсивности фотосинтеза

Таблица 2

Соотношение интенсивности дыхания и фотосинтеза культуры *Chlorella sp. K* при 36 и 43° (проточное культивирование)

Плотность культуры, млн/мл	Температура, °С	Время пребывания при данной Т°С, часы	Интенсивность дыхания (Д)		Интенсивность фотосинтеза (Ф)		$\frac{Д}{Ф} \times 100 \%$
			на объем суспензии, мл/час	на млн. клеток, мл/час	на объем суспензии, мл/час	на млн. клеток, мл/час	
600	38	∞	0,052	88,6	1,02	1700	5,0
612	43	0,6	0,104	170,0	1,02	1666	10,2
612	43	14,0	0,104	170,0	0,335	592	28,2
565	43	36,0	0,102	185,0	0,237	472	38,1

при 43°. При этом интенсивность дыхания при 43° оставалась практически неизменной и возрастание $\frac{D}{\Phi}$ происходило из-за уменьшения интенсивности фотосинтеза культуры.

В опыте (табл. 2) культивирование и измерение фотосинтеза проводились при таких сочетаниях поверхностной плотности ($300 \cdot 10^6$ кл/см²) и освещения (с двух сторон по $500 \cdot 10^3$ эрг/см²·сек), когда облученность всех клеток в суспензии составляла не менее чем $80 \cdot 10^3$ эрг/см²·сек. Поэтому, вероятно, соотношение $\frac{D}{\Phi}$ определяется соотношением этих

процессов в клетке и незначительно или совсем не искажено популяционными эффектами, имея в виду особенности светового режима.

Таким образом, проведенные опыты дают возможность оценить соотношение интенсивности дыхания и фотосинтеза в норме (при 36°) и при переходе к ЭТ (43°). В этом интервале температур интенсивность дыхания примерно удваивается (Q_{10} близко к 2), приводя к увеличению материально-энергетических потерь на единицу возникающих продуктов фотосинтеза. Если скорректировать регистрируемый фотосинтез на дыхание, то оказывается, что истинный фотосинтез в первый период после перехода к 43° больше (по меньшей мере на 5%), чем таковой при 36°.

Это делает особенно интересным прямое изучение кинетики фотосинтеза при переходе от 36 к 43°.

Кинетика фотосинтеза *Chlorella* sp. K при переходе к экстремальной температуре

Измерение фотосинтеза методом Винклера после суточного и трехсуточного пребывания культуры при 43° дало нулевые значения, хотя в первые 2 часа выделение O₂ было больше, чем при 36°. Измерения фотосинтеза через 1, 14 и 36 час. пребывания при 43° дали (табл. 2) уменьшающиеся значения. Для уточнения этих отрывочных данных была осуществлена непрерывная регистрация фотосинтеза в условиях интенсивного проточного культивирования водорослей. Было учтено, что температура является инградиентным, равномерно действующим на все клетки популяции фактором, а освещенность клеток в элементарных слоях культуры, и, следовательно, их фотосинтез, является выраженным градиентным параметром, приводящим к сложной структуре фотосинтетической продукции в оптически плотной суспензии [27]. Это важно учесть при изучении динамики фотосинтеза популяции при переходе к ЭТ. Несмотря на постоянство «светлых» и «темных» слоев в полностью поглощающей свет суспензии стабилизированной плотности, доля их участия в суммарном газообмене при повышении T должна измениться: возрастает удельный вес «темного» слоя (D_T), приводя к снижению регистрируемого фотосинтеза культуры (Φ_K), даже если фотосинтез просвечиваемого слоя (Φ_C) останется без изменения

$$\Phi_K^{43} = \Phi_C^{43} - D_T^{43} < \Phi_K^{36} = \Phi_C^{36} - D_T^{36}$$

так как заведомо, как показано выше, $D_T^{43} > D_T^{36}$.

Имея это в виду, при измерениях фотосинтеза было точно учтено световое поле внутри популяции, исходя из оптических свойств штамма [28] и сочетания плотности культуры и интенсивности света.

Результаты представлены на рис. 12, А. На рис. 12, Б даны характеристики световых полей внутри популяции в каждом из опытов. Кривая 4 на рис. 12, А отражает программу изменения T во время опытов.

Как видно из рис. 12, при переходе от оптимальной к ЭТ интенсивность фотосинтеза в течение первых 1,5—2 час. возрастает, затем уменьшается, достигая нулевого значения примерно к 14—20-му часу пребы-

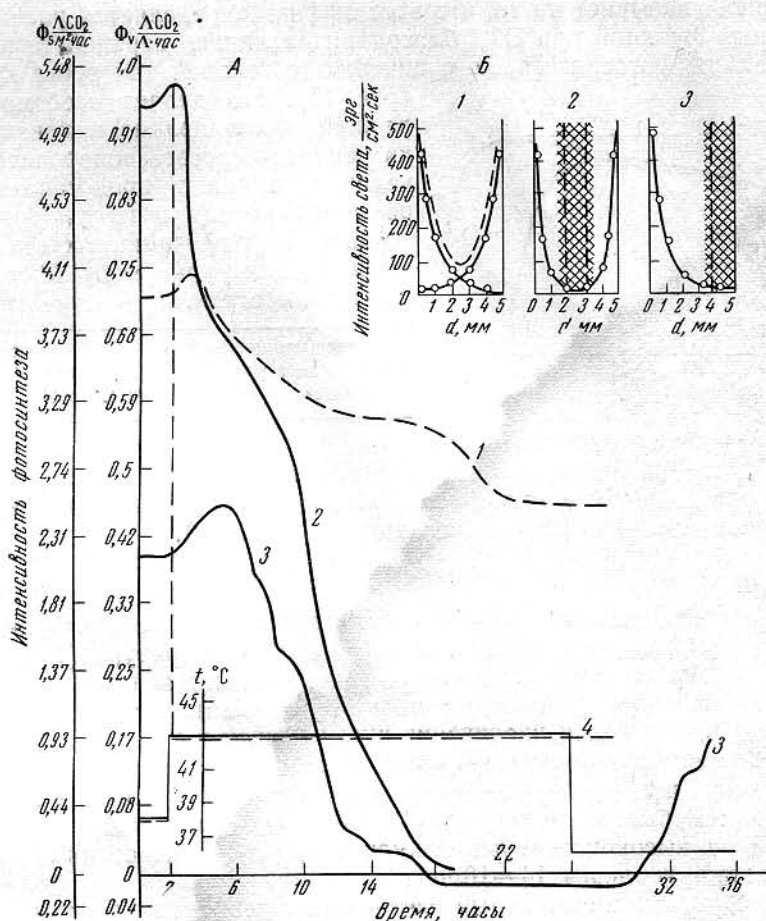


Рис. 12. Временной ход фотосинтеза *Chlorella* sp. К при переходе от оптимальной к экстремальной температуре

А — кинетика фотосинтеза; 1 — $I = 500 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ (с двух сторон), $N = 600 \cdot 10^8 \text{ клеток/мл}$; 2 — $I = 550 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ (с двух сторон), $N = 1350 \cdot 10^8 \text{ клеток/мл}$; 3 — $I = 590 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ (с одной стороны), $N = 800 \cdot 10^8 \text{ клеток/мл}$; 4 — кривая программы изменения T во время опытов; Б — характеристика светового режима внутри популяции в каждом из опытов

вания при 43° . К этому времени в клетке в большом количестве возникают включения (рис. 8), что дает основание считать, что затухание фотосинтеза при 43° определяется накоплением в клетках ассимилятов. В случае высоких плотностей суспензии (кривые 2, 3) зарегистрировано даже выделение CO_2 на свету. Когда же все клетки в популяции находятся при освещении не менее $100 \cdot 10^3 \text{ эрг/см}^2 \cdot \text{сек}$ (рис. 12, Б), интенсивность фотосинтеза затухает медленнее (кривая 1, рис. 12, А) и через 28 час. остается еще значительной.

Рассмотренные данные указывают на сохранение при 43° — температуре, экстремальной для роста культуры (размножения клеток), — функциональной активности фотосинтетического аппарата (рис. 12), за счет чего и происходило отмеченное выше накопление биомассы в культуре при 43° и увеличение веса отдельных клеток; снижение фотосинтеза скорее всего определяется накоплением в клетках неиспользуемых ассимилятов. Были получены также данные, указывающие на обратимость действия экстремальной для роста данного штамма температуры: размножение клеток *Chlorella* sp. К возобновлялось при изменении T с 43 на 36° .

Таким образом, проведенное изучение эффекта укрупнения клеток *Chlorella* sp. К при 43° и сопровождающих это явление физиологических

изменений указывает на то, что этот эффект определяется разобщением клеточных функций при ЭТ, благодаря различию верхней температурной границы фотосинтеза, по сравнению с таковой для роста культуры (рис. 13). Это делает особенно интересным исследование изменений химического состава водорослей в этих условиях и может представлять интерес для изучения пути углерода в фотосинтезе, локализации в клетках ассимилятов, для управления биосинтезом микроводорослей.

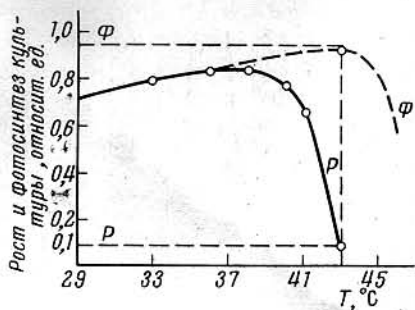


Рис. 13. Характеристика верхней температурной границы для функций роста (P) и фотосинтеза (Ф) культуры *Chlorella* sp. K

Авторы пользуются случаем и приносят благодарность А. П. Райковой и Н. И. Райкову за помощь в получении электронно-микроскопических снимков клеток, а также М. М. Соловьеву за предоставленную возможность съемки на микроскопе Zetopan (Reichert).

ВЫВОДЫ

1. При выращивании водоросли *Chlorella* sp. K в условиях интенсивной культуры, но при высокой экстремальной температуре (43°) наблюдается явление гипертрофированного роста клеток и значительное (в 5—6 раз, по сравнению с нормальными) укрупнение их размеров при одновременном торможении увеличения числа клеток в культуре.

Этот эффект развивается во времени, зависит от интенсивности света и концентрации клеток при засеве: чем выше интенсивность света и меньше засев, тем быстрее и до больших значений происходит укрупнение клеток. При высокоинтенсивном культивировании отчетливый эффект наблюдается уже через 14—16 час.

2. На фоне ЭТ интенсивный свет (оптимальный для роста культуры при оптимальной температуре) выступает как фактор, приводящий к фотоингибированию развития и роста числа клеток в культуре.

3. В результате сравнительного изучения при 36° и 43° роста числа клеток в культуре, ее фотосинтетической продуктивности и накопления органического вещества, веса и микроструктуры отдельных клеток, интенсивности дыхания, интенсивности и кинетики фотосинтеза при переходе от оптимальной температуры к экстремальной показано, что указанный эффект определяется разобщением клеточных функций развития и фотосинтеза благодаря различию верхней температурной границы для этих процессов и сопровождается накоплением биомассы. Происходящее при экстремальной температуре постепенное снижение фотосинтеза определяется накоплением в клетках ассимилятов, и при переходе к оптимальной температуре фотосинтез возобновляется.

4. Разобщение клеточных функций хлореллы посредством воздействия ЭТ может представлять интерес для управления биосинтезом водорослей и получения биомассы с направленно измененным химическим составом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Жукова Т. С., Кованова Е. С. Сб. Управл. биосинтез. Изд-во «Наука», 1966.
2. Сабинин Д. А. Физиол. развития растений. Изд-во АН СССР, 1963.
3. Максимов Н. А. Кратк. курс физиол. растений. Сельхозгиз, 1948.
4. Джеймс В. Дыхание растений. Изд-во иностр. лит., 1956.
5. Sorokin S. Nature, 184, 613, 1959.
6. Sorokin S., Myers J. Carnegie Inst. Wash. Year Book, 53, 31, 1954.
7. Далецкая И. А., Чулановская М. В. Бот. ж., 8, 147, 1964.

8. Pirson A., Lorenzen H. Z. Bot., 46, 53, 1958.
9. Sorokin C., Krauss R. W. Plant. Physiol., 36, 242, 1961.
10. Спекторов К. С. Физиол. растений, 10, 667, 1963.
11. Lorenzen H. Flora, 753, 554, 1963; Forträge aus dem Gesamtgebiet der Botanik E. F., 1, 231, 1962.
12. Клячко-Гурвич Г. Л., Семененко В. Е. Сб. Изучение интенсивной культуры водорослей. Докл. III коорд. совещ. по проблеме СЭВ-а. Прага, 143, 1965.
13. Владимирова М. Г., Кованова Е. С. Сб. Управл. биосинтез. Изд-во «Наука», 1966.
14. Клячко-Гурвич Г. Л. Физиол. растений, 11, 978, 1964.
15. Tamiya H., Hase E., Shibata K., Mituya A., Iwashima T., Nichei T., Sasa T. Carn. Inst. Wash. Publ., 600, 204, 1953.
16. Rodríguez-Lopez M. Nature, 199, 506, 1963.
17. Wanka F. Arch. Mikrobiol., 34, 161, 1959.
18. Kessler E., Kramer H. Arch. Mikrobiol., 37, 245, 1960.
19. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Ничипорович А. А. Пробл. космич. биол. Изд-во АН СССР, 2, 314, 1962.
20. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Ничипорович А. А. Пробл. космич. биол. Изд-во АН СССР, 2, 326, 1962.
21. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Попова М. А., Цоглин Л. Н. Сб. Управл. биосинтез. Изд-во «Наука», 1966.
22. Семененко В. Е., Владимиров М. Г., Цоглин Л. Н., Таутс М. И., Филипповский Ю. Н., Клячко-Гурвич Г. Л., Кузнецов Е. Д., Кованова Е. С., Райков Н. И. Сб. Управл. биосинтез. Изд-во «Наука», 1966.
23. Владимирова М. Г., Таутс М. И., Феоктистова О. И., Семененко В. Е. Сб. Изучение интенсивной культуры водорослей. Докл. III коорд. совещ. СЭВ-а, Прага, 1965.
24. Владимирова М. Г., Игнатъевская М. А., Райков Н. И. Сб. Управл. биосинтез. Изд-во «Наука», 1966.
25. Владимирова М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
26. Кузнецов Е. Д., Владимирова М. Г. Физиол. растений, 11, 615, 1964.
27. Семененко В. Е., Филипповский Ю. Н., Владимирова М. Г., Таутс М. И., Цоглин Л. Н., Ничипорович А. А. Пробл. управл. биосинтеза и биофизики популяций. Тез. докл. Красноярск, 1965.
28. Филипповский Ю. Н., Семененко В. Е., Ничипорович А. А. Сб. Фотосинтезирующие системы высокой продуктивности. Изд-во «Наука», 1966.

Поступила в редакцию
23.XII.1965

A. PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF CHLORELLA UNDER CONDITIONS OF HIGH EXTREMAL TEMPERATURES

I. UNCOUPLING EFFECT OF EXTREME TEMPERATURES ON THE CELLULAR FUNCTIONS OF CHLORELLA

V. E. SEMENENKO, M. G. VLADIMIROVA, O. B. ORLEANSKAYA

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

Hypertrophied cell growth and a very considerable increase (by 5—6 times) of cell dimensions compared to the normal cells accompanied by simultaneous depression of cell division was observed in *Chlorella* grown in an intense culture and at a high temperature (43°C). This effect becomes more pronounced with time. It depends on the light intensity and initial cell concentration; the higher the light intensity and lower the initial cell concentration the greater is the rate at which increase of cell size occurs and the greater is the size of the cells. The effect is appreciable after 14—16 hours of intense cultivation. At extreme temperatures a high light intensity is essentially a factor which causes photoinhibition of the development and growth of the cells. Increase of cell number, photosynthetic productivity, accumulation of organic matter, weight and microstructure of cells, respiration rate, rate and kinetics of photosynthesis on transition from an optimal temperature to an extreme temperature were studied. These studies showed that the effect under consideration is determined by a decoupling of the cellular development function and photosynthesis which in turn is due to a difference between the upper temperature boundary for these processes. The effect is accompanied by an accumulation of biomass. The gradual decrease of the rate of photosynthesis at the extremal temperature is due to accumulation of assimilates in the cells; transition to an optimal temperature results in restoration of photosynthesis. Decoupling of the cellular functions of *Chlorella* by means of extremal temperatures may be exploited for regulating alga biosynthesis and obtaining biomass with a prescribed chemical composition.