

ДЕГРАДАЦИЯ ПИГМЕНТОВ У *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITL.
В УСЛОВИЯХ ГОЛОДАНИЯ ПО ФОСФОРУ

В условиях глубокого лимитирования роста микроводоросли *Spirulina platensis* минеральным фосфором на свету происходит полное разрушение всех видов пигментов. Разрушается также и биомасса, причем степень разрушения зависит от интенсивности света. Скорость разрушения пигментов у клеток, голодающих по фосфору, значительно выше, чем у клеток, голодающих по азоту. При внесении порции фосфатов пигменты и биомасса начинают восстанавливаться. Скорость восстановления определяется предысторией культуры. В темноте в течение восьми дней пигменты и биомасса оставались неизменными, в последующие дни наблюдалось снижение их концентрации.

В последнее время в гидробиологической практике все большее внимание исследователей привлекают оптические методы, дающие с высокой степенью точности информацию о спектральных характеристиках веществ, находящихся в водоеме. Существует ряд работ, посвященных использованию этой информации для оценки распределение фитопланктона и его биомассы. Вся сложность данной проблемы состоит в том, что оптическими методами измеряется не биомасса фитопланктона, а его оптические характеристики, которые определяются наличием в клетках фотосинтетических пигментов. Для того, чтобы по оптическим характеристикам клеток судить о биомассе, необходимо знать соотношения двух величин: концентрации пигментов в клетках и самой биомассы. Это соотношение весьма изменчиво. На культурах микроводорослей показано, что при различных условиях, в которых находились клетки, величина относительного содержания пигментов может варьировать в десятки раз [17]. Поэтому возник вопрос о поисках зависимости относительного содержания пигментов в растительных клетках от влияния различных факторов внешней среды. В этом направлении проведено немало исследований теоретического и экспериментального характера [1, 13, 16, 18 и др.].

Установлено, что из всех факторов доминирующую роль играют световые условия, поскольку свет является источником энергии для многих метаболических процессов, в том числе и биосинтеза пигментов. С другой стороны, на свету в присутствии кислорода происходит фотодеструктивное окисление пигментов [5]. Таким образом, в клетках на свету происходит два процесса: синтез и разрушение пигментов, а соотношение удельных скоростей синтеза и фотодеструктивного окисления пигментов определяет величину относительного содержания пигментов в клетках микроводорослей. Опираясь на этот факт и используя методы теории массового обслуживания, был предложен подход [11], который позволил объяснить каким образом происходит изменение концентрации пигментов в клетках. Для условий стационарного динамического состояния были получены уравнения светозависимого содержания пигментов в микроводорослях [12].

Более сложным для описания являются любые переходные процессы. В работе [3] была сделана попытка описать динамику изменения концентрации пигментов при блокировании синтеза пигментов неорганическим азотом. Еще более сложен случай ограничения роста минеральным фосфором, поскольку фосфор, в отличие от азота, не является элементом, входящим в структуру молекул пигментов, и биосинтез пигментов ограничивается не за счет самого фосфора, а недостатком энергоемких, фосфорсодержащих молекул. Лимит по фосфору затрагивает все процессы метаболизма, связанные с потребностью в энергии. Например, у *Spirulina maxima* голодание по фосфору сопровождается не только угнетением фотосинтеза, но и уменьшением количества нуклеиновых кислот и фосфорных эфиров [15]. Еще раз нужно подчеркнуть следующее: принципиальная разница между азотом и фосфором состоит в том, что фосфор, кроме структурной функции в мембранах, участвует в энергетическом обмене.

Мы поставили задачу проследить динамику изменения концентрации пигментов у синезеленых микроводорослей на примере *Spirulina platensis* при глубоком лимитировании ее роста минеральным фосфором.

Материал и методы. Эксперименты проводились с 20.03 по 13.04.2001г. Объектом исследования послужила микроводоросль *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., полученная из коллекции культур Л. А. Ланской (ИнБИОМ). *S. platensis* выращивали на среде Заррука [20] в культиваторе из органического стекла с реакторами плоско-параллельного типа с рабочей длиной кюветы 1 см, в условиях круглосуточного освещения лампой ДРЛ-750. Интенсивность света на поверхности реактора колебалась, составляя в среднем 7 клк для первого реактора и 9,5 клк для второго. Равномерное перемешивание суспензии микроводорослей в реакторе осуществляли барботированием воздуха с помощью компрессорной установки (1,5 л воздуха/1 л культуры в мин).

Водоросли выращивали, используя метод непрерывного культивирования [10]. После стабилизации оптической плотности суспензии водоросли были переведены на среду Заррука без источника фосфора (K_2HPO_4). Для этого 2,5 л суспензии *S. platensis* были отфильтрованы с помощью нейлонового газа (№ 100 ПЭ). Полученную пасту дважды отмыли предварительно приготовленной бесфосфорной средой. Отмытую пасту залили средой без фосфора объемом 2,5 л и разделили на три части. Две части объемом по 1 л поместили в реакторы 1 и 2, а третью часть поместили в темноту. Постоянный объем суспензии поддерживался дистиллированной водой в течение всего эксперимента.

Ежедневно измеряли pH с помощью универсального ионметра ЭВ-74. Температура колебалась около $27 \pm 3^\circ C$ на свету и $19 \pm 2^\circ C$ в темноте. Содержание пигментов в клетках определяли по оптической плотности характерных полос поглощения (D514 – каротиноиды, D620 – фикоцианины, D680 – хлорофилл), делая поправку на неспецифическое поглощение при длине волны 750 нм (рис.1). Оптическую плотность определяли с помощью регистрирующего спектрофотометра "Specord UV" (Karl Zeis, Германия).

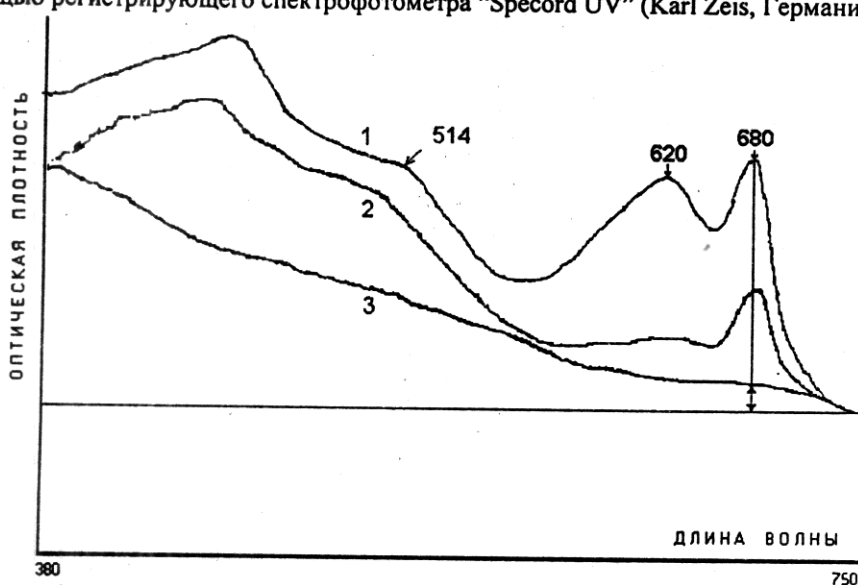


Рисунок 1. Спектр поглощения культуры *Spirulina platensis* в условиях: 1 – нелимитированного роста; 2 – голодания по азоту; 3 – голодания по фосфору. Стрелками показана величина ошибки при измерении относительного содержания хлорофиллов

Figure 1. Absorption spectrum of culture *Spirulina platensis* under following conditions: 1 – unlimited growth; 2 – nitrogen starvation; 3 – phosphorus starvation. Arrows show an error at chlorophyll measuring

На шестой день в реактор № 1 и на седьмой день в реактор № 2 была внесена порция K_2HPO_4 (2,5 г/л).

Результаты и обсуждение. В накопительной культуре количество биомассы и пигментов, как правило, увеличивается экспоненциально. Отношение хлорофилл/фикоцианин (Хл/Фц) колеблется около единицы. Это отношение является одним из самых чувствительных показателей обеспеченности клеток минеральным азотом [14],

поскольку при любых лимитах по азоту на свету, в первую очередь, снижается концентрация фикобилипротеинов [8]. Отношение Хл/Фц может изменяться на порядок [14]. По результатам наших экспериментов, при лимитах по фосфору отношение Хл/Фц, в сравнении с лимитом по азоту, меняется незначительно, т.е. содержание хлорофиллов и фикоцианинов снижается практически одновременно. Недостаток минерального фосфора нарушает синтез любых пигментов, блокируя синтез на уровне транскрипции [19].

После перенесения клеток на среду, лишенную минерального фосфора, культура на свету приобретала желто-зеленую окраску, и на 6–7-й день голодания по фосфору клетки полностью теряли пигменты. В поле зрения микроскопа клетки выглядели бесцветными, при этом сохраняли свою спиралевидную структуру и жизнеспособность. Спектры поглощения культур, голодающих по фосфору и, для сравнения, по азоту представлены на рис. 1. В будущем особенно полезным окажется спектр поглощения биомассы, не содержащей пигментов, поскольку учет неспецифического поглощения обычно делают при длине волны 750 нм, полагая при этом, что биомасса во всей видимой области имеет оптическую плотность равную оптической плотности при 750 нм. На рис. 1

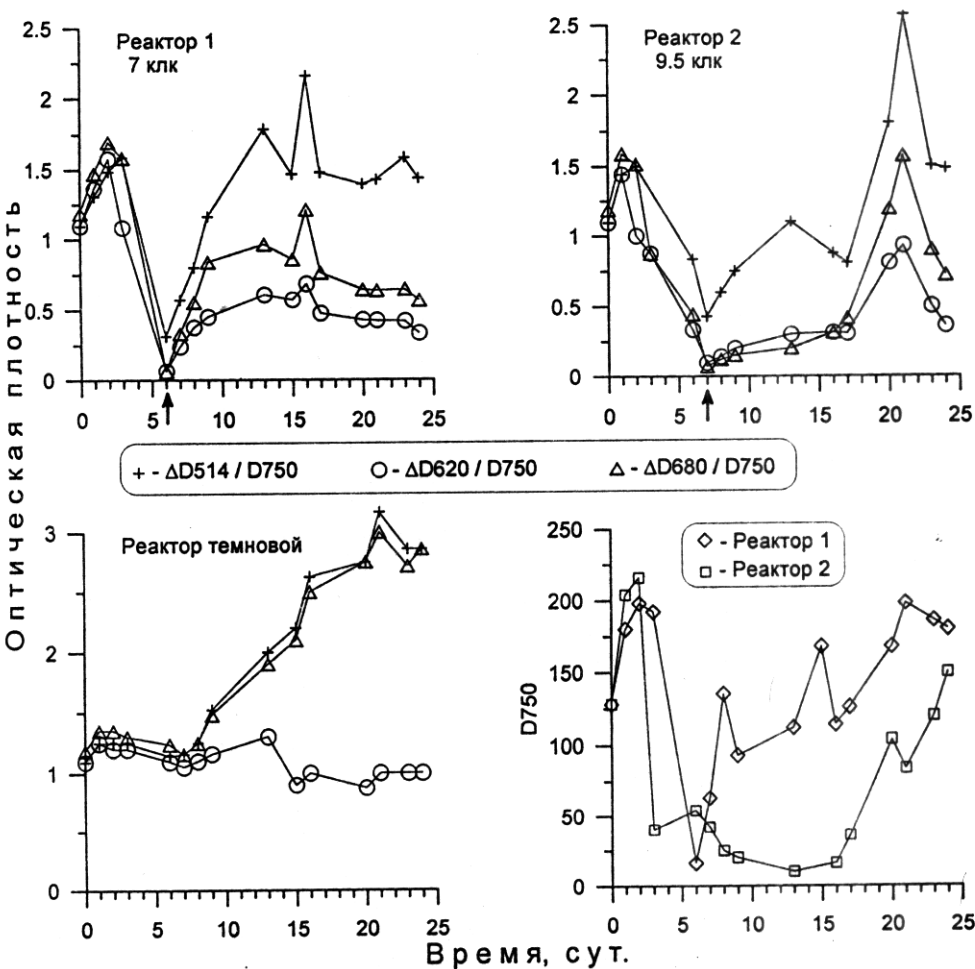


Рисунок 2. Динамика изменения оптической плотности культуры *Spirulina platensis* после перенесения клеток на среду без фосфора. Стрелки указывают момент добавления фосфатов в среду

Figure 2. Change dynamics of culture *Spirulina platensis* absorbency after placing of cells on medium without phosphorus. Arrows show phosphate adding into medium

показано, что для оценки относительного содержания хлорофиллов измерение оптической плотности при длине волны 680 нм дает ошибку около 10%. И эта ошибка возрастает

тает при снижении относительного содержания пигментов. Особенно велика ошибка в

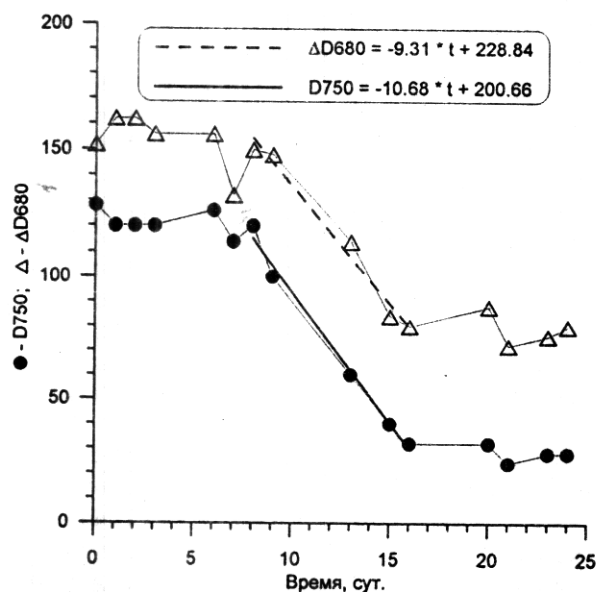


Рисунок 3. Динамика изменения оптической плотности (абсолютные единицы) культуры *Spirulina platensis* после переведения клеток на среду без фосфора в темноте

Figure 3. Change dynamics of culture *Spirulina platensis* absorbency (absolute data) after placing of cells on medium without phosphorus in darkness

что на свету за 3–4 дня концентрация пигментов упала практически до нуля. Неблагоприятное воздействие оказывает лимит по фосфору и на саму биомассу, поскольку в первую очередь страдают все мембранные структуры [6].

Вместе с тем, сразу после перенесения клеток на среду, лишенную фосфора, интенсивный рост прекратился. Но, благодаря относительно высокому содержанию неорганического фосфора в клетках *S. platensis* [2], в первые два дня эксперимента биомасса увеличилась приблизительно на 60–70 %.

Как только в среду была внесена порция фосфора, пигментная система и биомасса начинали восстанавливаться. Способность к восстановлению определялась степенью разрушения биомассы, т.е. предысторией культуры. В первую очередь восстанавливались каротиноиды, причем характер изменений оптической плотности во времени в области поглощения каротиноидами был одинаков для реакторов 1 и 2, чего нельзя сказать о восстановлении хлорофиллов и фикоцианинов. Картина восстановления этих пигментов в обоих реакторах была неодинаковой. Казалось бы, добавление фосфатов в среду должно повлечь за собой у голодающих по фосфору клеток резкое восстановление пигментной системы и рост биомассы, как это наблюдалось в реакторе 1, однако, в реакторе 2 с более высокой облученностью хлорофиллы и фикоцианины восстанавливались с некоторой задержкой. Более того, наличие фосфатов в питательной среде не остановило процесс разрушения биомассы (рис. 2). По литературным данным [7], существует обратно пропорциональная зависимость между скоростью потребления неорганического фосфора водорослями и его внутриклеточным содержанием. Повидимому, в данном случае эта зависимость не выполняется и необходимо дополнительно учитывать степень разрушения биомассы.

В темноте пигменты и биомасса не разрушались. Концентрация биомассы оставалась неизменной 8 дней, на девятый - началось ее уменьшение. Срок в 9 дней, вероятно, объясняется способностью синезеленых водорослей на свету накапливать полисахариды, которые в темноте расходуются как резервный материал. У облигатно фототроф-

Ранее было показано, что при азотном голодании концентрация пигментов снижается до некоторой минимальной величины, но полного разрушения пигментов не происходит [3]. При лимитах по фосфору на свету разрушаются даже каротиноиды, хотя они, как правило, более устойчивы к фотодеструкции [5]. Голодание по фосфору клетки переносят более болезненно, по сравнению с азотом. Даже при более низкой облученности скорость разрушения пигментов в наших экспериментах превышала скорость разрушения пигментов в клетках, голодающих по азоту, в пять раз. На рис. 2 показано,

ной *Anabaena variabilis* именно так и происходит [4]. При отсутствии световой энергии темновое дыхание – единственный процесс, позволяющий клеткам удовлетворять свои энергетические потребности. Известно, что кроме полисахаридов в процессе дыхания могут также использоваться жиры, липиды, белки и др. В результате естественного отбора клетки приобрели способность в темноте сохранять свою пигментную систему до тех пор, пока не исчерпаются энергетические запасы. В противном случае, сразу же после окончания темного периода клетки теряли бы способность фотосинтезировать, что снижало бы шансы на выживание.

Отмечено, что в темноте относительное содержание пигментов в растительных клетках повышается [9]. Мы также наблюдали это явление. На 9-й день относительное содержание хлорофиллов и каротиноидов повысилось (рис. 2). На рис. 3. показано (в абсолютных единицах), что на девятый день уменьшаются концентрации и биомассы, и хлорофиллов. Никакого повышения содержания пигментов не происходит. Пигменты в темноте не синтезируются. По нашему мнению, этот факт объясняется тем, что удельные скорости снижения концентрации пигментов и биомассы неодинаковы. Пигменты разрушаются медленнее. Даже в таких неблагоприятных условиях стратегия выживания у клеток остается прежней – стратегия сохранения пигментной системы.

Выводы. На свету при глубоком лимитировании по фосфору *Spirulina platensis* полностью теряет пигменты, но сохраняет жизнеспособность. При добавлении фосфора в питательную среду пигментная система полностью восстанавливается. Скорость ее восстановления зависит от предыстории культуры. В темноте концентрации пигментов и биомассы в течение 8 дней оставались неизменными, затем наблюдалось их снижение.

1. Белянин В. Н., Ковров Б. Г. К математической модели биосинтеза в светолимитированной культуре микроводорослей // ДАН СССР. – 1968. – 179, № 6. – С. 1463 – 1466.
2. Биохимия синезеленых водорослей / Судьина Е. Г., Шнюкова Е. И., Костлан Н. В., Мушак П. А., Турик Н. Д. – Киев: Наук. думка, 1978. – 264 с.
3. Геворгиз Р. Г. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Нестационарный процесс // Альгология. – 1998. – 8, № 3. – С. 69 – 74.
4. Корженевская Т. Г., Гусев М. В. Метаболизм и деструкция синезеленой водоросли *Anabaena variabilis* // Микробиология. – 1976. – 45, вып. 5. – С. 795 – 799.
5. Мерзляк М. Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. – М.: ВИНТИ, 1989. – 6. – С. 1 – 167.
6. Орт Д., Говинджи, Уитмарш Дж. и др. Фотосинтез: В 2-х т. Т. 1 / Под ред. Говинджи. – М.: Мир, 1987. – 728 с.
7. Пархоменко А. В. Поглощение фосфатов микропланктоном в эвфотической зоне Черного и Средиземного морей: дисс. ... канд. биол. наук. - Севастополь, 1988. – 165 с.
8. Стадничук И. Н. Фикобилипротеины. Биологическая химия (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР). М: Мир. – 1990. – 40. – С. 1 – 196.
9. Терешкова Г. М. Исследование устойчивости хлореллы к темновому периоду, равному «Лунной ночи» / Интенсивная светокультура растений. – Красноярск, 1977. – С. 214 – 227.
10. Терсков И. А., Гительзон И. И. Применение непрерывного плотностатного процесса для управляемого культивирования микроорганизмов // Непрерывное управляемое культивирование микроорганизмов. – М.: Наука, 1967. – С. 3 – 13.
11. Тренкеншу Р. П., Геворгиз Р. Г. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Модель. Теоретическая часть // Альгология. – 1998. – 8, № 2. – С. 170 – 177.
12. Тренкеншу Р. П., Геворгиз Р. Г. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Стационарный процесс // Альгология. – 1998. – 8, № 3. – С. 273 – 277.
13. Тренкеншу Р. П., Вопилова Л. В. Модель светозависимого содержания хлорофилла а в микроводорослях // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук. – 1984 - № 22, вып.13. – С. 3 – 7.
14. Шендерова Л. В., Венедиктов П. С. Деградация пигментов у *Synechocystis aquatilis* в условиях азотного голодания при различной освещенности // Микробиология. – 1980. – 49, вып. 6. – С. 906 – 910.
15. Baldia S. F., Fukami K., Nuishijima T., Hata Y. Growth response of *Spirulina platensis* to some physico-chemical factors and the kinetics of phosphorus utilization // FISH.-SCI. - 1995. – 61, N 2. – P. 331 – 335.
16. Falkowski P.G. Kinetics of adaptation to irradiance in *Dunaliella tertiolecta* // Photosynthetica. –

1984. – 18, N 1. – P. 62 – 28.

17. Geider R. J. Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton // New Phytol. – 1987. – 106, N 1. – P. 1 – 34.
18. Geider R. J., MacIntyre H. L., Kana T. M. A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton // Limnol. Oceanogr. – 1996. – 41, N 1. – P. 1 – 15.
19. Latasa M., Berdalet E. Effect of nitrogen or phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp // J. Plankton Res. – 1994. – 16, N 1. – P. 83 – 94.
20. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology / Ed. Vonshak A. – London: Taylor & Francis, 1997. – P. 218.

Институт биологии южных морей НАН Украины
г. Севастополь

Получено 15.04.2002

R. G. GEVORGIZ, Y. N. GOLOVNYA

PIGMENTAL DEGRADATION IN *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITL
UNDER PHOSPHORUS STARVATION

Summary

Full destruction of all kinds of pigments takes place under light in deep limited mineral phosphorus growth of microalgae *Spirulina platensis*. Biomass is destructed too. The destruction level is depend on light intensity. Pigment destruction velocity of cells in phosphorus starvation is considerably higher than the velocity during pigment destruction by nitrogen starvation cells. By adding phosphate pigment biomass begin also to rehabilitate. The velocity of rehabilitation is determined by culture history. In darkness biomass and pigments were invariably during 8 days. Decrease of their concentrations was observed next days.