

Т. В. ЕФИМОВА, А. Б. КОЖЕМЯКА

**ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАТОМОВЫХ
PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM И *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*,
АДАПТИРОВАННЫХ
К РАЗЛИЧНЫМ СПЕКТРАЛЬНЫМ СВЕТОВЫМ УСЛОВИЯМ**

Изучена фотоадаптационная реакция морских диатомовых микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum* и *Pseudo-nitzschia delicatissima* на три спектральных распределения света (белый, синий, красный). Показано, что количество поглощённых квантов линейно связано с удельным содержанием Хл *a* (отношение $C : Xl\ a$) и не зависит от спектрального состава падающего света. Действие спектрального состава света так же не влияет на поглощающие свойства *Phaeodactylum tricornutum* и *Pseudo-nitzschia delicatissima*.

Эффективность поглощения света разного спектрального состава зависит от пигментного состава водорослей, что обусловлено их различной таксономической принадлежностью. Сравнение скорости фотосинтеза и роста на сине-фиолетовом, синем, зелёном, красном и белом свете у различных групп морских прокариотических и эукариотических водорослей (Cyanobacteria, Prymnesiophyta, Chlorophyta, и Bacillariophyta) показало, что качество света влияет на исследуемые параметры в зависимости от размера водорослей и содержания в них пигментов [4, 12]. В этих экспериментах действие спектрального состава света у одной и той же группы водорослей различалось. Межвидовые различия внутри одной таксономической группы могут быть обусловлены различиями связанными со скоростью роста, пигментным содержанием или геноспецифичной изменчивостью.

Цель работы – изучить особенности фотоакклимации двух видов диатомовых – *Phaeodactylum tricornutum* и *Pseudo-nitzschia delicatissima*, к действию света с тремя разными спектральными характеристиками.

Материал и методы. Объектом исследования служили диатомовые водоросли *Phaeodactylum tricornutum* и *Pseudo-nitzschia delicatissima* из коллекции отдела экологической физиологии водорослей Института биологии южных морей. До проведения опытов культуры выращивались при естественном дневном освещении.

В опытах с *P. tricornutum* использована среда f/2, с *P. delicatissima* – среда Гольдберга с добавлением 50 мк моль Si на литр среды. Барботаж суспензии микроводорослей производился микрокомпрессором. Круглосуточный режим освещения обеспечивался люминесцентной лампой Oreol White / 15 W. Красный и синий режимы освещения созданы комбинированием белого света [2] и цветных фильтров (рис. 1). На основании спектральных характеристик фильтров культуры были уравнены по количеству падающего на них света.

Культуры выращивали в хеостатном режиме в плоскопараллельной стеклянной кювете объёмом 1,2 л и толщиной слоя 25 мм. Подача питательной среды осуществлялась насосом с программируемой скоростью протока. Для *P. tricornutum* задавалась скорость деления клеток в сутки, равная 0,16; для *P. delicatissima* – 0,2. Численность клеток измеряли методом прямого счёта [1]. Аликвоты для проведения анализов отбирались из культиваторов в трёхкратной повторности.

Для определения органического углерода культуры фильтровали через GF/C фильтры и сжигали в CHN анализаторе после обработки 15 % соляной кислотой [8]. Коэффициент корреляции определения углерода составил 0,95.

© Т. В. Ефимова, А. Б. Кожемяка, 2008

Сухой вес водорослей определяли по разности масс фильтра с профильтрованной культурой и пустого фильтра, просушенных до постоянного веса. Относительная погрешность измерения составляла 0,5 % для *P. tricornutum* и 1,5 % - для *P. delicatissima*.

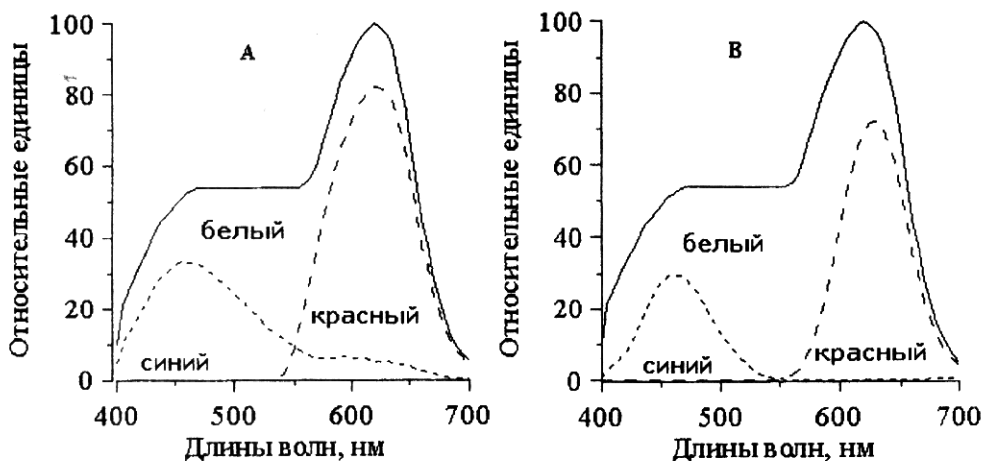


Рисунок 1. Относительные спектры белого, синего и красного источников освещения: А - для *P. tricornutum*, В - для *P. delicatissima*

Figure 1. Relative spectra of white, blue and red lighting sources: А - *P. tricornutum*, В - *P. delicatissima*

Для определения концентрации Хл *a*, Хл *c* ($c_1 + c_2$), суммарных каротиноидов и спектра поглощения света водорослями их фильтровали через GF/C фильтры. Пигменты определяли путём экстракции 90 % водным раствором ацетона. Оптическую плотность ацетоновых экстрактов определяли на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре Specord UV-VIS. Концентрации Хл *a* и Хл *c* определяли по уравнению [7], суммарные каротиноиды - по уравнению [13].

Спектры поглощения света водорослями определяли на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре Specord UV-VIS. Оптическая плотность собранной на фильтре взвеси - $OD_{fp}(\lambda)$ - определялась на увлажнённых средой фильтрах (для сравнения был использован увлажнённый чистый фильтр). Спектры поглощения света детритом в пробе - $OD_{fd}(\lambda)$ - были получены после обработки фильтров метанолом. Для пересчёта $OD_{fp}(\lambda)$ и $OD_{fd}(\lambda)$ в значения оптической плотности взвеси ($OD_p(\lambda)$) и детрита ($OD_d(\lambda)$) в суспензии было использовано уравнение [9]. Далее эти данные были использованы в расчёте спектров поглощения взвеси

$$\alpha_p(\lambda) = 2.3 OD_p(\lambda) / l_g, \text{ м}^{-1}$$

и детрита

$$\alpha_d(\lambda) = 2.3 OD_d(\lambda) / l_g, \text{ м}^{-1},$$

где 2.3 - коэффициент для перехода от десятичного логарифма к натуральному; l_g - геометрическая длина пути, м².

Спектр поглощения света водорослями ($\alpha_{ph}(\lambda)$) найден по разности спектров поглощения взвеси и детрита. Затем проведена нормировка на содержание Хл *a* ($\alpha_{phchl}(\lambda)$, м² / мг Хл *a*). Спектрально-зависимый коэффициент поглощения был рассчитан [10]:

$$\alpha_{ph/chl}^* = \frac{\int_{400}^{700} \alpha_{ph/chl}(\lambda) PAR(\lambda) d\lambda}{\int_{400}^{700} PAR(\lambda) d\lambda}$$

Поглощенный свет рассчитан умножением $\alpha_{ph/chl}^*$ на Е, моль (мг Хл а)⁻¹ час⁻¹.

Результаты. Морфологические и физиологические характеристики двух видов водорослей, адаптированных к белому, синему и красному свету, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Фотоадаптационная реакция диатомовых микроводорослей *P. delicatissima* и *P. tricornutum* на спектральный состав света

Table 1. Diatoms microalgae *P. delicatissima* and *P. tricornutum* photoadaptational response to the spectral composition of light

Параметры	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>			<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>		
	Белый	Синий	Красный	Белый	Синий	Красный
Макс. скорость роста, м	0,4	1,7	0,6	1	0,5	0,8
Среднее по спектру $\alpha_{ph/chl}$, м ² / мг Хл а	0,012	0,013	0,012	0,014	0,011	0,012
$\alpha_{ph/chl}^*$, м ² / мг Хл а	0,014	0,018	0,006	0,011	0,020	0,006
$\alpha_{ph/chl}$ (440), м ² / мг Хл а	0,028	0,036	0,027	0,033	0,029	0,026
$\alpha_{ph/chl}$ (675), м ² / мг Хл а	0,019	0,016	0,017	0,022	0,015	0,019
α_{ph} (440) / α_{ph} (675)	1,5	2,3	1,6	1,5	1,9	1,3
Объем клеток, мкм ³	-	-	-	256	330	270
С, пг / клетка	2,4	2,0	2,9	35,4	40,4	29,0
Сухой вес, пг / клетка	8,1	7,9	7,2	110,1	211,7	84,3
С / сухой вес	0,30	0,26	0,40	0,33	0,19	0,34
Хл а, пг / клетка	0,06	0,02	0,14	0,65	0,56	0,61
Хл с (с ₁ + с ₂), пг / клетка	0,013	0,008	0,022	0,126	0,155	0,130
Суммарные каротиноиды, пг / клетка	0,033	-	0,059	0,362	0,275	0,291
Хл с / Хл а	0,22	0,40	0,16	0,20	0,27	0,21
Каротиноиды / Хл а	0,55	-	0,43	0,55	0,50	0,48
Хл а / сухой вес	0,005	0,003	0,019	0,006	0,003	0,007
С / Хл а	43	84	21	56	72	47

Скорость роста *P. tricornutum* на синем свету была в 3 раза выше, чем на красном и белом, у *P. delicatissima* максимальная скорость роста наблюдалась при белом освещении (табл. 1).

Максимальная величина удельного коэффициента поглощения Хл а $\alpha_{ph/chl}$ при 675 нм отмечена на белом свету, минимальная – на синем. Максимальный коэффициент $\alpha_{ph/chl}$ при 440 нм у *P. tricornutum* был на синем свету, у *P. delicatissima* – на белом, минимальный – у обоих видов на красном свету. Средний по спектру коэффициент $\alpha_{ph/chl}$ варьирует незначительно (табл. 1), форма спектров в зависимости от спектрального состава света не изменяется (рис. 2). Однако, амплитуда синего пика у обоих видов на синем свету выше, чем на белом. В то же время, при адаптации *P. delicatissima* к красному свету амплитуда синего пика меньше на 13 %, чем при белом свете. Форма спектров поглощения света пигментами в 90 % ацетоновом экстракте и амплитуда пиков не изменяются (рис. 3). Для *P. tricornutum*, как и в случае поглощения света живой культурой, наблюдается незначительное уменьшение амплитуды синего пика у водоросли, адаптированной к красному свету (данных по синему свету нет). Амплитуды синего пика в ацетоновом экстракте *P. delicatissima* остались без изменений. Изменения амплитуды синего пика в спектрах поглощения света живыми клетками, по-видимому, являются следствием действия эффекта упаковки. Таким образом, спектральный состав света не влиял на поглощающие свойства данных видов.

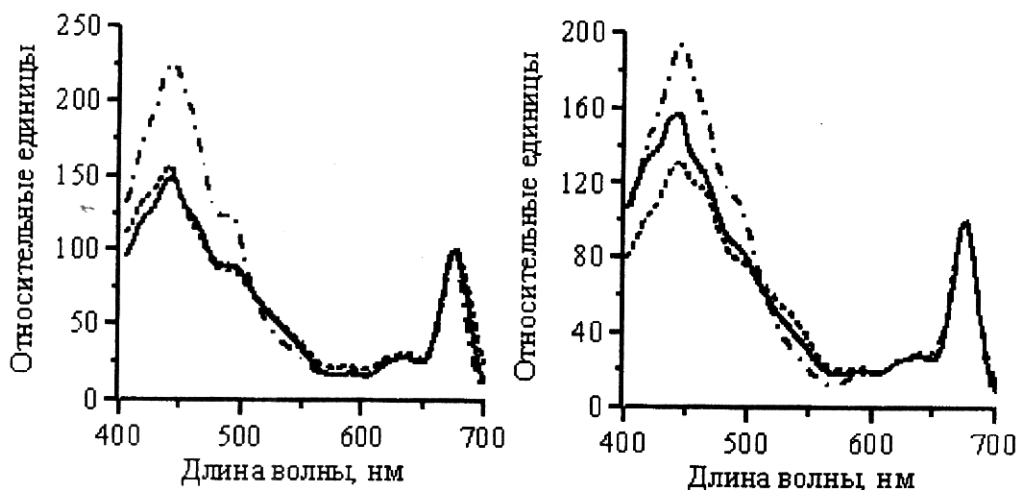


Рисунок 2. Нормированные спектры поглощения света культурами адаптированными к трём различным качествам света (—— белый, ----- красный, — · — синий): А – *P. tricornutum*, В – *P. delicatissima*

Figure 2. The normalized absorption light spectra of cultures adapted to three different light qualities (—— white, ----- red, — · — blue): А – *P. tricornutum*, В – *P. delicatissima*

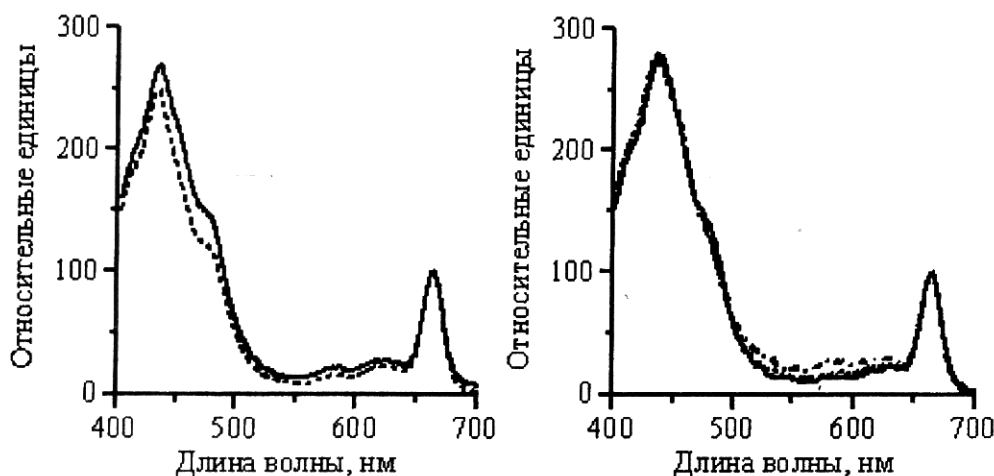


Рисунок 3. Нормированные спектры поглощения света пигментами в ацетоновом экстракте при адаптации к трём различным качествам света (—— белый, ----- красный, — · — синий): А – *P. tricornutum*, В – *P. delicatissima*.

Figure 3. The normalized light absorption spectra with pigments in the acetone extracts at the adaptation to three different light qualities (—— white, ----- red, — · — blue): А – *P. tricornutum*, В – *P. delicatissima*

Действие спектрального состава света на внутриклеточное содержание пигментов отличалось для обоих видов диатомовых. Содержание внутриклеточного Хл *a* у *P. tricornutum*, выращенного на синем свете, было на 33 % ниже, чем у выращенного на белом свете, а при адаптации к красному свету - в 2,3 раза превышало значения для белого света. У *P. delicatissima* содержание внутриклеточного Хл *a* значительно не изменялось. Содержание суммарного внутриклеточного Хл *c* у *P. tricornutum*, адаптированного к синему свету, уменьшилось на 36%, а к красному – увеличилось на 69 % по

отношению к белому свету. У *Pseudo-nitzschia delicatissima* содержание суммарного внутриклеточного Хл *c* осталось относительно постоянным. Внутриклеточное содержание суммарных каротиноидов у *P. delicatissima*, адаптированной к синему и красному свету, уменьшилось на 24 и 20 % соответственно по отношению к белому свету. У *P. tricornerutum*, выращенного на красном свету, внутриклеточное содержание суммарных каротиноидов увеличилось на 79 %. Таким образом, содержание внутриклеточных пигментов у *P. tricornerutum*, выращенного на синем свету, уменьшалось по отношению к выращенному на белом свету, а при адаптации к красному свету – увеличивалось. У *P. delicatissima* содержание внутриклеточных пигментов оставалось относительно постоянным (табл. 1.).

Количество внутриклеточного углерода у *P. tricornerutum* для синего света было ниже на 17 % и выше на 21 % для красного света по сравнению с белым, у *P. delicatissima* оно варьировало в пределах 17 %. Количество сухого веса в клетках *P. tricornerutum* не изменилась при различном характере освещения. У *P. delicatissima*, выращенной на синем свету, величина сухого веса на клетку значительно увеличилась по отношению к выращенной на белом свету, при этом и максимальный объём клеток наблюдался на синем свету (табл. 1).

Для обеих культур прослеживается зависимость отношения $C : \text{Хл } a$ от количества поглощённого света (для *P. tricornerutum* отношение $C : \text{Хл } a$ увеличилось в 4 раза при увеличении количества поглощённого света в 4,6 раз; для *P. delicatissima* – в 1,5 раза при увеличении количества поглощённого света в 3,6 раз) (рис. 4).

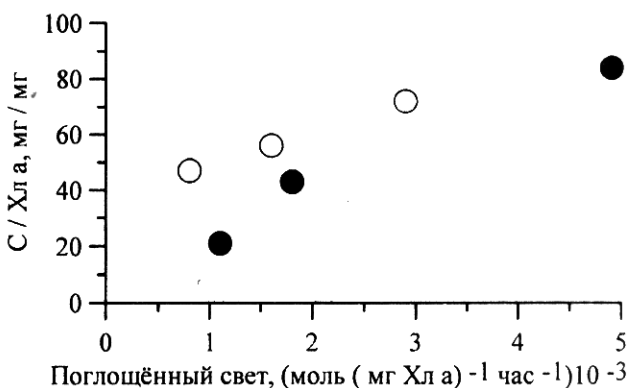


Рисунок 4. Зависимость отношения $C : \text{Хл } a$ от количества поглощённого культурами света (○ - *P. delicatissima*, ● - *P. tricornerutum*)

Figure 4. $C : \text{Chl } a$ ratio as a function of absorbed light (○ - *P. delicatissima*, ● - *P. tricornerutum*)

Обсуждение. Внутриклеточная концентрация Хл *a*, а, следовательно, и отношение Хл *a* : C уменьшаются при увеличении освещённости [3]. В исследовании, проведённом со *Skeletonema costatum*, показано, что отношение $C : \text{Хл } a$ находится в линейной зависимости от освещённости и от количества поглощённого света [11].

В наших экспериментах освещённость была примерно одинакова для трёх спектрально-различных источников света, а отношение $C : \text{Хл } a$ значительно отличалось при различных спектральных составах света (наименьшие значения соответствуют красному свету, наибольшие – синему свету). Следовательно, фотоадаптационный ответ при адаптации к разному спектральному составу света может проявляться в изменении отношения $C : \text{Хл } a$. Но из-за селективного характера поглощения водорослями света данного спектрального состава (на красном свету поглощается наименьшее количество квантов, на синем – наибольшее (табл. 1.), при расчётах поглощённого света количество

поглощённых квантов будет линейно зависеть от отношения $C : \text{Хл } a$, а не от падающего света. Таким образом, качество света не играет роли в колебаниях данного параметра.

В наших исследованиях адаптации диатомовой *P. delicatissima* не выявлено различия удельного содержания $\text{Хл } a$ в зависимости от спектрального состава света, как и для *Phaeodactylum tricornutum* в работе [5]. В нашем же опыте с *P. tricornutum* отмечено уменьшение внутриклеточного содержания $\text{Хл } a$ при адаптации к синему свету, что, однако, согласуется с данными, полученными для диатомовых *Biddulphia aurita* и *Thalassiosira rotula* [6, 12]. При адаптации к красному свету данные об увеличении внутриклеточного содержания $\text{Хл } a$ у *P. tricornutum* уже расходятся с результатами этих исследований, где у *Thalassiosira rotula* отмечено уменьшение внутриклеточного содержания $\text{Хл } a$ [12], а у *Biddulphia aurita* без изменений [6].

Скорости роста культур при различных спектральных условиях освещения у диатомовых также отличаются: *Phaeodactylum tricornutum* и *Thalassiosira pseudonana* быстрее росли при синем освещении, чем при белом [5, 4], *Biddulphia aurita* такой реакции не проявила, но при красном освещении росла медленнее [6], а скорость роста *Thalassiosira rotula* была независима от качества света [12]. *P. tricornutum* в нашем эксперименте, как и в [5], на синем свету рос быстрее, чем на белом, *P. delicatissima* замедляла скорость роста.

Выводы. 1. У видов *Phaeodactylum tricornutum* и *Pseudo-nitzschia delicatissima* количество поглощённых квантов линейно связано с удельным содержанием $\text{Хл } a$ (отношение $C : \text{Хл } a$) и не зависит от спектрального состава падающего света. 2. Спектральный состав света не влияет на поглощающие свойства *Phaeodactylum tricornutum* и *Pseudo-nitzschia delicatissima*.

1. Владимирова М.Г., Семененко В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей (инструкция по первичным испытаниям, выделяемых из природы и селекционируемых форм фотоавтотрофных одноклеточных водорослей). – М.: АН СССР, 1962. – 60 с.
2. Справочная книга по светотехнике / Под ред. Ю.Б. Айзенберга. – М.: Энергоатомиздат, 1983. – 472 с.
3. Finenko Z. Z., Hoepffner N., Williams R., Piontkovski S. A. Phetoplankton carbon to chlorophyll *a* ratio: response to light, temperature and nutrient limitation // Морс. эколог. журн. – 2003. – 2, № 2. – С. 40 – 64.
4. Glover H.E., Keller M.D., Spinrad R.W. The effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1987. – 105. – P. – 137 – 159.
5. Holdsworth E.S. Effect of growth factor and light quality on the growth, pigmentation and photosynthesis of two diatoms, *Thalassiosira gravida* and *Phaeodactylum tricornutum* // Mar. Biol. – 1985. – 86. – P. 253 – 262.
6. Humphrey G.F. The effect of the spectral composition of light on the growth, pigments, and photosynthetic rate of unicellular marine algae // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1983. – 66. – P. 49 – 67.
7. Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen. BPP. – 1975. – 167, No. 2. – P. 191 – 197.
8. Methods of seawater analysis / ed. by K. Grasshoff, M. Ehrhardt, K. Kremling. – 2, rev. Ans extended ed. – Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie. – 1983. – 419 p.
9. Mitchell B. G. Algorithms for determining the absorption coefficient of aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT) / Ocean Optics X/R. - Spinrad editor, SPIE Bellingham, Washington. – 1990. – P. 137 – 148.
10. Morel A. Available, usable, and stored radiant energy in relation to marine photosynthesis // Deep-Sea Res. – 1978. – 25. – P. 673 – 688.
11. Nielsen M.V., Sakshaug E. Photobiological studies of *Skeletonema costatum* adapted to spectrally different light regimes // Limnol. Oceanogr. – 1993. – 38, No. 7. – P. 1576 – 1581.
12. Rivkin R.B. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth // Mar. Ecol. Prog. Ser. – 1989. – 55. – P. 291 – 304.

13. *Strickland J.D., Parsons T.R.* Pigment analysis: spectrophotometric determination of chlorophylls and total carotenoids. Section IV.3.1. In a practical handbook of seawater analysis // 2nd ed. Bulletin 167. Fish. Res. Bd. Can. – 1972.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Поступила 14 мая 2008 г.

T. V. EFIMOVA, A. B. KOZHEMYAKA

**PHOTOBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF DIATOMS
PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM AND *PSEUDO-NITZSCHIA DELICATISSIMA*
ADAPTED TO SPECTRALLY DIFFERENT LIGHT REGIMES**

Summary

Photoadaptational response of marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Pseudo-nitzschia delicatissima* to three light spectral distributions (white, red, and blue) was studied. The absorbed quantum quantity is a linear function of the specific Chl *a* content (*C* : Chl *a* ratio) and is independent of the spectral composition of incident light. The influence of spectral light composition also does not affect absorption properties of *Phaeodactylum tricornutum* and *Pseudo-nitzschia delicatissima*.