

Российская академия наук
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН
Общество физиологов растений России
Научный совет по физиологии растений и фотосинтезу
РАН

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
СОВРЕМЕННОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Всероссийская научная конференция с
международным участием и школа для молодых
ученых,
посвященная 125-летию Института физиологии
растений им. К.А. Тимирязева РАН

Москва, 23-27 ноября 2015 г.

Сборник материалов

**Москва
2015**

Влияние температуры на динамику темновой потере биомассы в культуре диатомовой водоросли *P. tricornutum*

Авсиян А.Л.

ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского
РАН, г. Севастополь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Темновая потеря биомассы (ТПБ) представляет важную составляющую в суточном балансе продуктивности микроводорослей и цианобактерий как в естественных фитопланктонных сообществах, так и при промышленном культивировании. ТПБ может составлять от 10 до 50% от дневной продукции [1, 2]. Основную долю ТПБ представляет эндогенный расход резервных соединений, главным образом, углеводов и липидов, путём темнового дыхания. Одновременно могут происходить процессы синтеза белка [3, 4, 5].

Phaeodactylum tricornutum – диатомовая водоросль, которая широко исследуется и применяется в альгобиотехнологии благодаря высокой скорости роста и способности накапливать биологически ценные вещества (полиненасыщенные жирные кислоты, пигменты – фукоксантин, диадиноксантин) [6, 7]. Исследования показывают, что при культивировании *P. tricornutum* в закрытых фотобиореакторах в условиях естественного освещения может достигаться продуктивность до 2,57 г·л⁻¹·сут⁻¹ [6].

Показано, что интенсивность темнового дыхания микроводорослей не постоянна во времени, а снижается с течением темнового периода [8]. Для зелёных водорослей также было установлено влияние температуры на интенсивность дыхания [8]. Но исследований динамики ТПБ в литературе крайне мало. Ранее нами было проведено исследование и предложена эмпирическая модель, описывающая динамику ТПБ с учётом удельной скорости эндогенного расхода резервных соединений для цианобактерии *Arthrospira platensis* [9]. Целью данной работы было исследование динамики снижения биомассы в темноте в культуре *P. tricornutum*, и определение влияния температуры на кинетические характеристики ТПБ.

МЕТОДЫ

В качестве объекта в эксперименте использовали альгологически чистую культуру одноклеточной диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin из коллекции культур ИМБИ РАН. Культивирование водорослей для предварительной адаптации осуществляли при свето-темновом режиме 16 : 8 (свет : темнота) на среде Тренкеншу А [10] в культиваторах плоско-параллельного типа с объёмом среды 3 л. Освещённость рабочей поверхности культиватора составляла 8 кЛк, температура – 20 °С. Ежедневно в конце темнового периода проводили 20 % обмен питательной среды. Из адаптированной культуры в конце светового периода отбирали по 150 мл в светонепроницаемые конические колбы на 250 мл в 3-кратной повторности и инкубировали при 4 вариантах температуры от 10 до 25 °С. Перемешивание культуры в темноте осуществлялось только непосредственно перед отбором проб. Отбор проб проводили через 1, 2, 3, 4, 6, 8 и 24 часа в темноте. В пробах измеряли оптическую плотность культуры на длине волны 750 нм в 5 мм кюветах на

фотоэлектроколориметре КФК-3, и рН на иономере И-160М. Биомассу (абсолютно сухой вес) вычисляли, используя коэффициент перехода от оптической плотности $k_{D750} = 0,576 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл.}^{-1}$ [7]

Общую темновую потерю биомассы (ТПБ) по отношению к начальной биомассе рассчитывали следующим образом:

$$NBL = \frac{B'_L - B_D}{B'_L} \cdot 100\% \quad (1),$$

где B'_L – биомасса в конце предыдущего светового периода, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; B_D – биомасса в конце темнового периода, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$ [2].

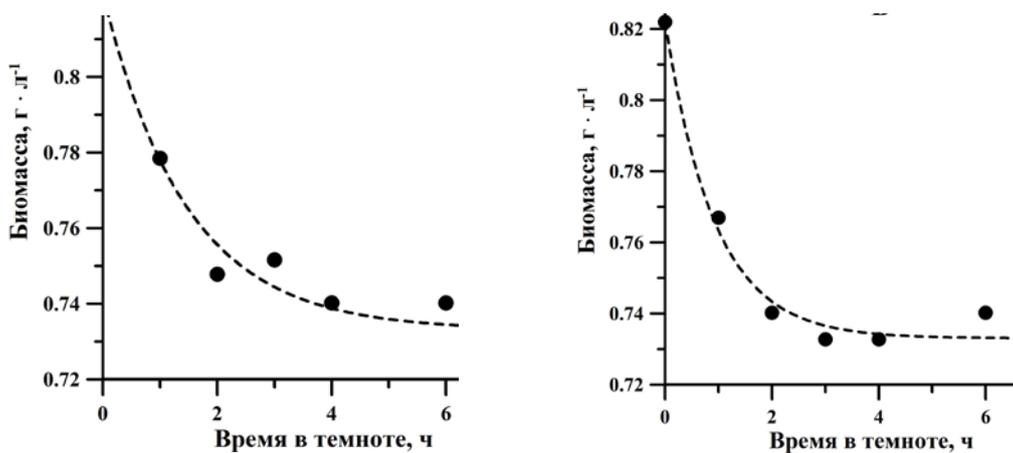
Для расчёта удельной скорости расхода биомассы использовали предложенную ранее и апробированную для *Arthrospira platensis* модель динамики снижения биомассы в темноте:

$$B = B_0 - L \cdot (1 - e^{-\mu_L t}) \quad (2),$$

где B_0 – плотность культуры в начале темнового периода, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; t – время от начала темнового периода, ч; L – общая потеря биомассы в темноте, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; μ_L – удельная скорость расхода резервных соединений, ч^{-1} [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Начальная плотность культуры во всех вариантах опыта составляла $0,82 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. При нахождении культуры микроводорослей в темноте во всех вариантах наблюдалось экспоненциальное уменьшение плотности культуры. Динамика темновой потери биомассы в культуре *P. tricornutum* представлена на рис. 1. На рисунках изображены данные за первые 8 ч в темноте, поскольку значения плотности культуры через 24 ч в темноте не отличались от значений через 8 ч.



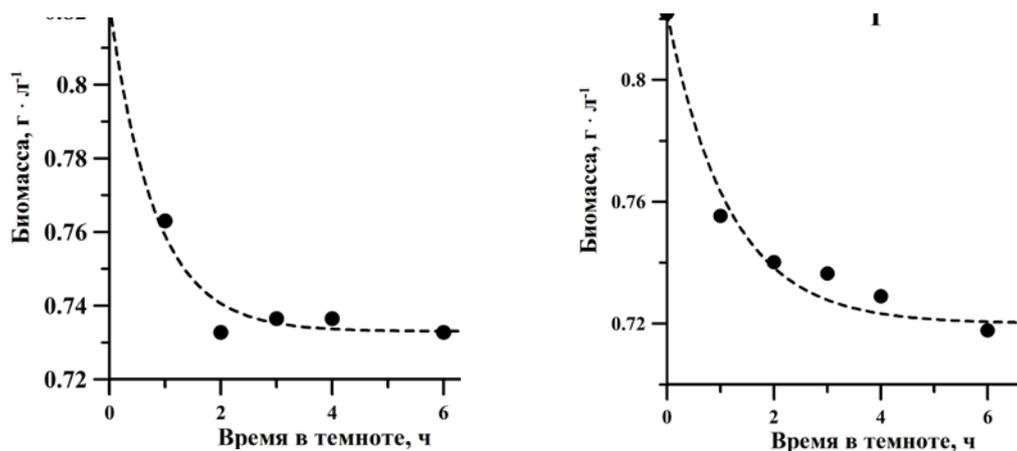


Рисунок 1. Динамика снижения биомассы в культуре *P. tricornutum* в темноте при различной температуре. Температура: А – 10 °С, Б – 15 °С, В – 20 °С, Г – 25 °С. Пунктирной линией обозначена аппроксимация данных по уравнению (2)

На основании полученных экспериментальных данных были рассчитаны количественные характеристики снижения плотности культуры в темноте. Была рассчитана ТПБ по уравнению (1), а также применено уравнение (2) для аппроксимации экспериментальных кривых и расчёта удельной скорости расхода резервных соединений. Расчётные значения представлены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристики темновой потери биомассы в культуре *P. tricornutum* при различной температуре

Температура, °С	10	15	20	25
Темновая потеря биомассы, %	10,8	10,8	10,8	12,4
Удельная скорость расхода резервных соединений μ_L , ч ⁻¹ .	0,68	1,08	1,23	0,86

Общая ТПБ для вариантов 10, 15 и 20 °С была одинаковой и равной 10,8% от начальной биомассы, и лишь при 25 °С ТПБ была выше и составила 12,4%.

Уравнение (2) с высокой точностью позволило описать динамику темновой потери биомассы, с R^2 от 0,972 до 0,986 для различных вариантов опыта. Удельная скорость расхода резервных соединений μ_L отличалась в разных вариантах опыта и варьировала от 0,68 до 1,23 ч⁻¹. В диапазоне 10 – 20 °С μ_L линейно возрастала с повышением температуры.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведённого исследования было показано, что биомасса в культуре *P. tricornutum* в темноте снижается экспоненциально, при этом основной расход биомассы происходит в первые часы темноты. Такой характер зависимости сходен с результатами, полученными для *A. platensis* в более раннем исследовании [9], а также с литературными данными о снижении интенсивности дыхания со временем нахождения в темноте [8].

Апробация модели динамики биомассы в темноте показала для культуры *P. tricornutum* хорошее соответствие экспериментальным данным и может применяться для вычисления

удельной скорости расхода резервных соединений. Экспоненциальный характер снижения плотности культуры микроводорослей позволяет предположить, что в первые часы темноты наиболее интенсивно расходуются резервные соединения (главным образом, углеводы), синтезированные на свету, и снижение их содержания в клетках приводит к снижению интенсивности темнового дыхания и расхода биомассы.

Возрастание удельной скорости потери биомассы с ростом температуры согласуется с данными [8] об увеличении интенсивности дыхания при повышении температуры для зелёных водорослей, а также с данными [5] о повышении ТПБ при повышении температуры для цианобактерии *A. platensis*.

В диапазоне 10–20 °С ТПБ была одинаковой, и μ_L линейно возрастала с увеличением температуры, в то время как при температуре 25 °С ТПБ была выше, а μ_L – ниже чем при 20 °С. Это может объясняться тем, что температура 25 °С выше температурного оптимума для *P. tricornutum*, в связи с чем может изменяться характер метаболических процессов и интенсивность дыхания. То, что ТПБ не изменялась в диапазоне 10–20 °С также может объясняться тем, что *P. tricornutum* – холодолюбивый вид и при этих температурах не происходило выраженного ингибирования обменных процессов, а накопленные за световой период резервные соединения полностью расходовались в течение темнового периода независимо от температуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Eppley R. W., Sharp J. I. Photosynthetic measurements in the central North Pacific: The dark loss of carbon in 24-h incubations // *Limnol. Oceanogr.* 1975. V. 20. – P. 981–987.
2. Hu Q., Guterman H., Richmond A. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities // *J. Phycol.* 1996. V. 32. P. 1066–1073.
3. Handa N. Carbohydrate metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum* // *Mar. Biol.* 1969. V. 4. P. 208–214.
4. Foy R. H., Smith R. V. The role of carbohydrate accumulation in the growth of planktonic *Oscillatoria* species // *Brit. Phycol. J.* 1980. V. 15, No 2. P. 139–150.
5. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R., Richmond A. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors // *J. Appl. Phycol.* 1991. V. 3. P. 103–109.
6. Molina Grima, E., Garcia Camacho, F., Sanchez Perez, J. A., Urda Cardona, J., Acien Fernandez, F. G., Fernandez Sevilla, J. M. Outdoor chemostat culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in a tubular photobioreactor for the production of eicosapentaenoic acid // *Biotechnol. Appl. Bioc.* 1994. V. 20. P. 279–290.
7. Meiser A., Schmid-Staiger U., Trösch W. Optimization of eicosapentaenoic acid production by *Phaeodactylum tricornutum* in the flat panel airlift (FPA) reactor // *J. Appl. Phycol.* 2004. V. 16. P. 215–225.
8. Grobbelaar J. U., Soeder C. J. Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds // *J. Plankton Res.* 1985. V. 7. P. 497–506.
9. Авсиян А. Л. Динамика потери биомассы в культуре *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Суанопрокарыота) в темновых условиях // *Альгология.* 2014. Т. 24. С. 417–420.
10. Тренкеншу Р. П., Белянин В. Н., Сидько Ф. Я. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования). Красноярск: ИФСО, 1981. 63 с. (Препринт / Ин-т физики, сиб. отд-ие; 18Б).