

РАЗМЕРНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* И *TETRASELMIS VIRIDIS* ПРИ РАЗНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Клочкова В.С.¹, Шумейко Д.М.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: viki-iki@mail.ru

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0636

Аннотация. В работе проведено исследование размерной структуры культур морских красной *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross и зелёной *Tetraselmis viridis* Rouch микроводорослей при накопительном и квазинепрерывном режимах культивирования с различной облучённостью. С помощью лазерного анализатора «Ласка-ТМ» и микроскопа с камерой определено распределение клеток по размерам. На основе выборки из 50 случайных клеток находили среднее значение диаметра. Показано, что в накопительном режиме культивирования размер клеток остаётся постоянным. Средний диаметр клеток порфиридиума составлял от 8,9 до 9,3 мкм, а тетраселмиса – от 6,8 до 7,4 мкм. Полученный результат подтверждается литературными данными по культивированию микроводоросли *Chlorella protothecoides*. Квазинепрерывный режим осуществляли в экспоненциальной фазе роста, когда плотность культуры невелика и единственный лимитирующим фактором является интенсивность светового потока. Экспериментально установлено, что с повышением облучённости средний диаметр клеток обеих микроводорослей увеличивается. Показано, что значения средних диаметров, полученные на лазерном анализаторе, завышены, чем результаты, полученные с помощью микроскопа. Полученные данные могут послужить основой при разработке моделей роста накопительной культуры микроводорослей. Постоянство среднего размера клеток позволяет отказаться от сложных распределённых моделей популяции клеток.

Ключевые слова: порфиридиум, тетраселмис, размерная структура, средний диаметр клеток, облучённость.

ВВЕДЕНИЕ

Рост микроводорослей в культуре напрямую связан с ростом каждой отдельной клетки, а также с её клеточным циклом, длительность которого зависит от физико-химических свойств среды. Интенсивность света является основным фактором, который определяет скорость роста микроводорослей и размерную структуру популяции. В литературе практически отсутствуют данные о механизмах влияния света на жизненный цикл клетки микроводорослей в условиях интенсивной культуры. Красная морская микроводоросль *Porphyridium purpureum* может рассматриваться как модельный объект при проведении подобных исследований благодаря практически сферическим клеткам от 4 до 9 мкм в диаметре, которые окружены мембраной с сульфатной полисахаридной оболочкой [1]. С практической точки зрения порфиридиум представляет интерес благодаря содержанию таких биологически активных веществ как: фотосинтетические пигменты (хлорофилл *a*, каротиноиды, В-фикоэритрин), внеклеточные экзополисахариды, а также ненасыщенные жирные кислоты, в том числе арахидоновая (накапливается до 36% от общего количества жирных кислот) и эйкозапентаеновая кислоты [2]. Клетка зелёной морской микроводоросли *Tetraselmis viridis* имеет симметричную, эллиптическую, слабо выпуклую с одной и вогнутую, с другой стороны, форму, её длина 3-13 мкм, ширина 2-10 мкм и толщина 3,5 мкм [3,4]. *T. viridis* содержит биологически активные вещества, необходимые для полноценного развития и жизни гидробионтов, поэтому он используется в качестве кормовой добавки. Пигментный состав тетраселмиса представлен хлорофиллами *a* и *b*, которые характерны для Chlorophyta, а также каротиноидами: β-каротин, зеоксантин, лютеин и ксантофиллы виолоксантинового ряда (неоксантин и виолоксантин) [3].

Цель работы: исследовать размерную структуру морских микроводорослей *P. purpureum* и *T. viridis* при накопительном и квазинепрерывном режиме культивирования, а также выявить зависимость среднего диаметра клеток от облучённости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные работы выполняли на базе кафедры «Физика» СевГУ. В работе использовались морские микроводоросли: красная *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross и зелёная *Tetraselmis viridis* Rouch. Обе культуры выращивали в накопительном и квазинепрерывном режимах. в плоскопараллельном фотобиореакторе объёмом 1,2 л, рабочая толщина культуры – 2 см. Нижняя грань фотобиореактора расположена под углом с целью улучшения перемешивания суспензий. Сверху культиватор закрывался пластиковой крышкой, в которой было выполнено отверстие для подачи воздуха, а также был оснащён системой охлаждения («водяной рубашкой»), обеспечивающей поддержание температуры. Использовали среду для морских водорослей [5].

Таблица 1. Значения переведённой облучённости и соответствующая ей освещённость

Лампы	клк	1	3	5	7	10
Светодиодные	Вт/м ²	5	14	23	32	45
Люминесцентные		3	10	17	24	34

Температуру стабилизировали на уровне 27 ± 1 °С. Барботаж культуры осуществляли аквариумным компрессором Hailea АСО-308 воздухом через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0,1 мм. Скорость подачи воздуха составляла 1 л/л культуры в минуту. Дополнительного введения углекислого газа не производилось. В качестве источников освещения использовали горизонтальную световую решётку из светодиодных LCD Feron LB-213 мощностью 10 Вт (для *P. purpureum*) и люминесцентных Philips Daylight TL-D 54-765 6G мощностью 18 Вт (для *T. viridis*) ламп. В таблице 1 представлены значения интенсивностей света, используемых в эксперименте.

Оптическую плотность культуры рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %. Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику, что позволяло снизить ошибку измерения оптической плотности культуры, связанную со светорассеянием. Пробы с оптической плотностью выше единицы предварительно разбавляли свежей питательной средой, подбирая коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-2 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2 – 0,6 единиц)

Для определения сухого веса 5 – 10 мл суспензии центрифугировали в течение 10 минут при 3000 об·мин⁻¹, сливали надосадочную жидкость, осадок промывали дистиллированной водой, повторно центрифугировали и сушили в течение суток при 55 °С. В результате получена линейная зависимость сухого веса от оптической плотности D_{750} , а коэффициент пропорциональности составил: для *P. purpureum* $k = 0,7$ г·СВ л⁻¹·ед. опт. пл⁻¹, а для *T. viridis* – $k = 0,9$ г·СВ л⁻¹·ед. опт. пл⁻¹.

Размерную структуру определяли с помощью лазерного анализатора «Ласка-ТМ» и микроскопа с камерой. На основе выборки из 50 случайных клеток находили среднее значение диаметра.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

В ходе эксперимента были получены накопительные кривые культур *P. purpureum* и *T. viridis*, представленные на рисунке 1. Пунктирными линиями условно были отмечены фазы роста: экспоненциальной, линейной, замедления, стационарной и фаза отмирания. На рисунке 2 представлена динамика среднего диаметра клеток для обоих видов водорослей, полученных на каждой фазе роста.

В течение экспериментов на каждой фазе роста накопительных кривых культур *P. purpureum* и *T. viridis* определялась размерная структура клеток. На экспоненциальной, линейной, замедления, стационарной и фазе отмирания для обоих исследуемых объектов средний диаметр клеток практически не изменялся: для порфиридиума размеры клеток варьировались от 8,9 до 9,3 мкм, что соответствует литературным данным для этого вида [6], а для тетраселмиса – от 6,8 до 7,4 мкм. Аналогичные данные приводятся в литературе для микроводоросли *Chlorella protothecoides* [7]. Авторами цитируемой работы показано, что средний диаметр клеток по ширине и по длине заметно не изменялся с течением времени. Размер клеток приблизительно соответствовал нормальному распределению. Во всех случаях средний диаметр клеток находился в пределах 3,93–4,12 мкм в длину и 2,95–3,15 мкм в ширину, соответственно.

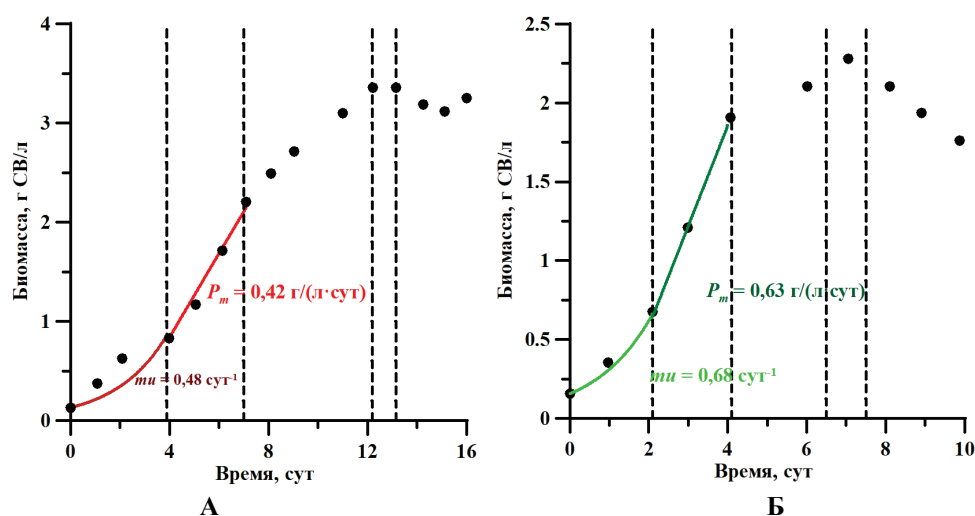


Рисунок 1. Накопительные кривые роста микроводорослей *P. purpureum* (А) при 23 Вт/м² и *T. viridis* (Б) при 17 Вт/м²

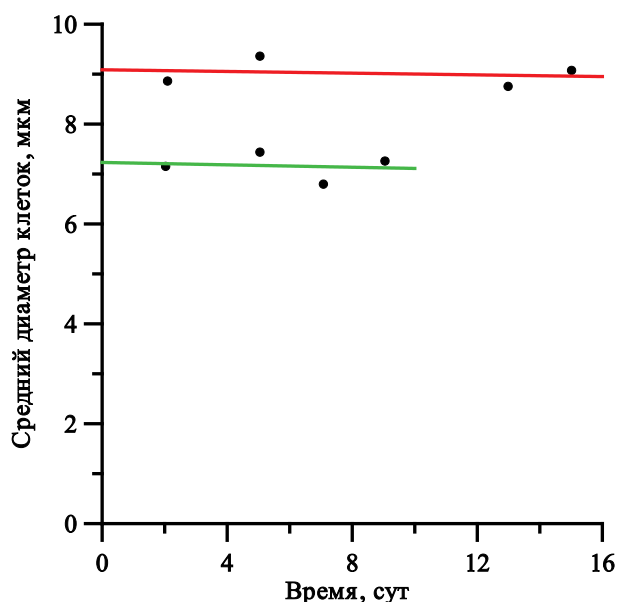


Рисунок 2. Средний диаметр клеток накопительных культур *P. purpureum* и *T. viridis*

Следующую серию экспериментов проводили в квазинепрерывном режиме культивирования. Обмен средой выполняли на экспоненциальной фазе, так как на ней оптическая плотность культуры невелика и можно изучать зависимость размерной культуры только от одного лимитирующего фактора – облучённости [8]. На рисунке 3 для примера представлены квазинепрерывные кривые роста культур *P. purpureum* при 23 Вт/м², и *T. viridis* при 17 Вт/м².

В таблице 2 представлены значения среднего диаметра клеток на экспоненциальной фазе роста, полученных для каждого значения облучённости для обоих видов водорослей. Очевидно, что с ростом облучённости увеличивается средний диаметр клеток культур *P. purpureum* и *T. viridis*. Данный вывод подтверждается с литературными данными [9], в которой показано, что размер клеток морской микроводоросли *Nannochloropsis* sp. с ростом интенсивности света увеличивался. Кроме того, следует обратить внимание на то, что значения средних диаметров, полученные на лазерном анализаторе, завышены, чем результаты, полученные с помощью микроскопа. Вероятно, это обусловлено тем, что калибровка лазерного анализатора осуществляется с помощью пластиковых шариков, которые имеют совсем другие оптические свойства, чем клетки исследуемого объекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в условиях обеспеченности биогенными элементами размеры клеток не зависят от фазы роста накопительных культур *P. purpureum* и *T. viridis*. Показано, что при выращивании культур в квазинепрерывном режиме, средний диаметр клеток будет увеличиваться с ростом облучённости. Полученные данные могут послужить основой при разработке моделей роста накопительной культуры микроводорослей.

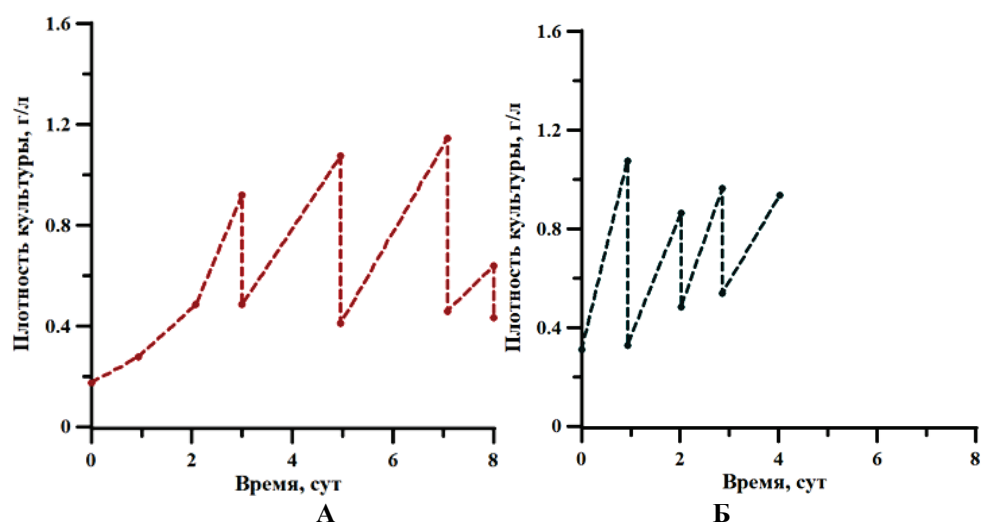


Рисунок 3. Квазинепрерывные кривые роста микроводорослей *P. purpureum* (А) при 23 Вт/м² и *T. viridis* (Б) при 17 Вт/м²

Таблица 2. Зависимость среднего диаметра и концентрации клеток культуры *P. purpureum* и *T. viridis* от облучённости. d_{cp} (м) – средний диаметр клеток, измеренных на микроскопе; d_{cp} (л) – средний диаметр клеток, измеренных на лазерном анализаторе «Ласка-ТМ»

Микроводоросль	E , Вт/м ²	d_{cp} (м), мкм	d_{cp} (л), мкм
<i>P. purpureum</i>	5	8,64	9,51
	14	8,92	9,6
	23	9,04	10,25
<i>T. viridis</i>	3	4,01	6,16
	10	4,21	6,75
	17	4,22	7,03
	24	4,25	7,14
	34	4,30	7,18

Постоянство среднего размера клеток позволяет отказаться от сложных распределённых моделей популяции клеток. Рост культуры может быть описан простейшими линейными дифференциальными уравнениями, основным параметром которых является биомасса совокупная масса клеток культуры.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», № гос. регистрации 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Dermoun D. et al. Modelling of growth of *Porphyridium cruentum* in connection with two interdependent factors: light and temperature. *Bioresource technology*, 1992, vol. 42, no. 2, pp. 113-117.
2. Akimoto M., Shirai A., Ohtaguchi K., Koide K. Carbon dioxide fixation and polyunsaturated fatty acid production by the red alga *Porphyridium cruentum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1998, vol. 73, pp. 269-278.
3. Чурилова Т.Я., Финенко З.З., Акимов А.И. Микроводоросли Черного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008 [Churilova T.Ya., Finenko Z.Z., Akimov A.I. *Black Sea microalgae: problems of biodiversity conservation and biotechnological use*. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2008 (In Russ.)].
4. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. Наука. Сиб. отд-ние, 1980 [Belyanin V.N., Sidko F.Y., Trenkenshu A.P. *Energetics of photosynthetic culture of microalgae*. Nauka. Siberian Branch, 1980 (In Russ.)].
5. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук*, 1981, т. 5, № 1, с. 75-82 [Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Proceedings of the Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR. Series of Biological Sciences*, 1981, vol. 5, no. 1, pp. 75-82 (In Russ.)].
6. Орлова Т.Ю., Сабущкая М.А., Маркина Ж.В. Изменение ультраструктуры морских микроводорослей из разных отделов в накопительной культуре. *Биология моря*, 2019, т. 45, № 3, с. 188-196, doi: 10.1134/S0134347519030100 [Orlova T.Y., Sabutskaya M.A., Markina J.V. Changes in the ultrastructure of marine microalgae from different departments in the accumulation culture. *Marine Biology*, 2019, vol. 45, no. 3, pp. 188-196 (In Russ.)].
7. Zhao J.M., Ma C.Y., Liu L.H. Temporal scaling of the growth dependent optical properties of microalgae. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 2018, vol. 214, pp. 61-70.
8. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей. Белгород: ООО «КОНСТАНТА», 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. *Modeling of microalgae growth*. Belgorod: CONSTANTA LLC, 2017, 152 p. (In Russ.)].
9. Wahidin S., Idris A., Shaleh S.R.M. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresource technology*, 2013, vol. 129, pp. 7-11.

SIZE STRUCTURE OF *PORPHYRIDIUM PURPUREUM* AND *TETRASELMIS VIRIDIS* POPULATIONS UNDER DIFFERENT CULTIVATION REGIMES**Klochkova V.S.¹, Shumeiko D.M.¹, Lelekov A.S.²**¹ Sevastopol State University

Universitetskaya str. 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nakhimov Ave. Nakhimova, 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: viki-iki@mail.ru

Received 03.08.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0636

Abstract. The study of the size structure of cultures of marine red *Purphurium purpurium* (Vogu) Ross and green *Tetraselmis viridis* Rouch microalgae under batch and quasi-continuous modes of cultivation with different irradiance was carried out. Cell size distribution was determined using a laser analyzer "Laska-TM" and a microscope with a camera. Based on a sample of 50 random cells, the mean diameter value was found. It is shown that in the accumulative mode of cultivation the cell size remains constant. The average cell diameter of *Porphyridium* cells ranged from 8.9 to 9.3 μm , and that of *Tetraselmis* from 6.8 to 7.4 μm . The result obtained is supported by literature data on cultivation of the microalga *Chlorella protothecoides*. The quasi-continuous regime was carried out in the exponential growth phase, when the culture density is low and the only limiting factor is the light flux intensity. It was experimentally found that the average cell diameter of both microalgae increased with increasing irradiance. It is shown that the values of average diameters obtained on the laser analyzer are overestimated than the results obtained using a microscope. The obtained data can serve as a basis for the development of growth models of the accumulative culture of microalgae. The constancy of the average cell size makes it possible to abandon complex distributed cell population models.

Key words: *Porphyridium*, *Tetraselmis*, size structure, average cell diameter, irradiation.