ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК: 581.1+579.22

Р. К. Пузанский, Е. Р. Тараховская, Ю. И. Маслов, М. Ф. Шишова

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ОСВЕЩЕННОСТИ НА РОСТ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

Введение

Скорость деления клеток, определяющая выживание популяции микроводорослей, зависит в первую очередь от доступности источников энергии и вещества. Для водорослей, как и для всех фототрофов, важнейшим источником энергии является свет, при этом большое значение имеют такие его свойства, как интенсивность и спектральный состав [1, 2]. Многие микроводоросли способны к миксотрофному питанию — использованию энергии света наряду с метаболизацией содержащихся в среде органических веществ. Такие организмы получают адаптивное преимущество, так как способны к оптимальному выбору способа питания в зависимости от условий среды [3, 4].

Изучение влияния органических веществ на рост и развитие микроводорослей в естественных условиях осложнено невозможностью контроля за изменениями окружающей среды. Использование лабораторных культур водорослей в качестве модели позволяет анализировать зависимость скорости размножения и интенсивности накопления метаболитов от внешних условий [5–9]. Данные о влиянии экзогенных органических веществ на развитие культур водорослей касаются в первую очередь ключевых компонентов трофического обмена, таких как глюкоза, малат, глицерин и др. Например, при добавлении глюкозы биомасса *Ankistrodesmus convolutus* возрастает в пять раз [10], а также существенно увеличивается плотность культур *Golenkinia minutissima* [11], *Platymonas subcordiformis* [12], *Micractinium pussilum* [13]. Показано, что действие экзогенных органических веществ на рост микроводорослей зависит от концентрации вносимого метаболита. Например, малат и ацетат оказывают стимулирующее действие на рост культур зеленой водоросли *Haematococcus pluvalis* в концентрациях, не превышающих 0,25%, а при более высоких концентрациях — ингибируют рост [14]. Действие глицерина и глицеральдегида на изменение биомассы *Phaeodactylum tricornutum* также зависит от их концентрации. При добавлении в среду глицерина в концентрации 0,01 или 0,1 М происходит лишь незначительное изменение скорости роста, конечная биомасса возрастает на четверть, а при концентрации 1 М скорость роста падает [15]. Глицеральдегид оказывает стимулирующее действие в концентрации 0,01, но не 0,5 М [16]. Характер влияния на скорость роста водорослей вносимых органических веществ определяется

© Р. К. Пузанский, Е. Р. Тараховская, Ю. И. Маслов, М. Ф. Шишова, 2011

их химической природой. Различия наблюдаются, даже если тестируемые вещества относятся к одному классу соединений. Так, плотность культуры хлореллы увеличивается в присутствии глюкозы или галактозы, но фруктоза, манноза, ксилоза и арабиноза подавляют размножение водоросли [17–19]. Особенности усвоения экзогенных органических соединений определяются частными чертами метаболизма водорослей. Например, клетки *Euglena gracilis* содержат высокоэффективные алкогольдегидрогеназы, способные окислять как этанол, так и спирты с более длинными и разветвленными углеродными цепями. Некоторые из них являются уникальными [20], другие — сходны с таковыми бактерий и грибов [21] или человека [22]. В клетках эвглены также обнаружены компоненты микросомальной системы окисления спиртов, подобные таковым у млекопитающих [23]. Сходство метаболизма, по-видимому, обусловлено тем, что предками эвгленовых были вступившие в симбиоз с зелеными водорослями гетеротрофные жгутиконосцы, филогенетически близкие к предкам *Animalia*. Эти особенности обменных процессов обеспечивают увеличение скорости деления клеток *E. gracilis* при утилизации спиртов [22, 24–27]. Разнообразием метаболизма водорослей и путей утилизации органических веществ можно объяснить различия в реакциях на внесение органики даже у представителей одного рода. Так, у *Chlamydomonas humicola* ацетат стимулирует рост биомассы [7], тогда как у *Ch. reinhardtii* подобной реакции не наблюдается [28]. Этанол и глицерин незначительно ингибируют рост *Dunaliella primolecta*, но заметно стимулируют рост *D. euchlora*. Присутствие в среде глюкозы несколько замедляет рост культур обоих видов *Dunaliella* [15]. Таким образом, у представителей одного рода могут наблюдаться межвидовые особенности в ответных реакциях на присутствие в среде органических субстратов.

Представители рода *Dunaliella* являются удобными объектами для изучения физиологических реакций микроводорослей на присутствие доступных органических соединений. Для исследования метаболических и сигнальных систем, вовлеченных в инициацию перехода к адаптивной миксотрофии, целесообразен сравнительный анализ роста и развития *D. salina* — гипергаллинного и *D. primolecta* — морского видов [29]. В ответ на сдвиг осмолярности окружающей среды для дуналиелл характерно изменение внутриклеточной концентрации глицерина [30, 31] посредством динамического баланса между синтетическими и катаболическими процессами [32, 33]. Интенсивность этих процессов опосредована различием в биотопах. Следовательно, между этими двумя видами могут быть выявлены метаболические различия, связанные с использованием органики. Общие и частные реакции микроводорослей при изменении условий выращивания могут быть охарактеризованы в результате сравнительного анализа близкородственных или филогенетически отдаленных друг от друга миксотрофов, например при сравнении зеленых водорослей и цианобактерий. Многие цианобактерии способны к миксотрофному питанию [34–38], в том числе представители рода *Anabaena*, изучению которых посвящен ряд исследований и для которых ранее была показана стимуляция роста при внесении органических субстратов [39].

Таким образом, цель нашей работы заключалась в сравнительном анализе роста и развития культур *Dunaliella primolecta, D. salina* и *Anabaena variabilis* при авто-, гетеро- или миксотрофных условиях питания.

Материалы и методы исследования

Общая характеристика объектов и культивирование. В данной работе в качестве объектов были использованы представители двух видов зеленых водорослей *Dunaliella primolecta* Butcher и *Dunaliella salina* Teod. и цианобактерии *Anabaena variabilis* штамм CALU 458 (неазотофиксирующий), полученные из коллекции водорослей лаборатории микробиологии СПбГУ. Водоросли культивировали на минеральных средах (табл. 1) при 22°С и постоянном освещении (7500 лк) лампами дневного света. Культуры периодически перемешивались.

Таблица 1. **Составы сред для культивирования водорослей**

	D. primolecta, %	*D. salina*, %	*A. variabilis*, %
NaCl	2,9	11,6	–
K_2HPO_4	0,003	0,02	–
$MgSO_4$	1,25	5	0,05
KNO_3	0,0625	0,25	0,3
Na_2HPO_4	–	–	0,05
$CaCl_2$	–	–	0,002

Примечание. Во все среды добавляли 1 мл/л смеси микроэлементов Cramer, Mayers 1982 (мод.)

Схема проведения экспериментов. Водоросли предварительно культивировали в колбах объемом 250 мл, из которых в начале каждого эксперимента отбирали пробы для определения исходной клеточной плотности, содержания белка и пигментов (исходная точка). Одновременно отбирали аликвоты культур для вариантов эксперимента: а) без добавления органических веществ (контроль); б) с добавлением глюкозы, глицерина или этанола в опытах *D. primolecta* и *D. salina*, а в опытах с *Anabaena variabilis* — глюкозы, фруктозы или этанола. Все органические вещества использовали в концентрации 0,5% (масса/объем). Через трое суток инкубацию завершали и проводили все необходимые измерения. В ходе работы анализировали относительные изменения плотности, содержания пигментов и белка за три дня. В каждом эксперименте за единицу принимали значение параметра в исходной точке эксперимента. Все опыты ставили в двух вариантах: при постоянном освещении и в темноте.

Методы определения плотности культур, количества белка и пигментов. Плотность культуры определяли подсчетом клеток в камере Горяева. Для определения белка пробы после экстракции пигментов подвергали обработке при 100°С в растворе, содержащем 0,5°М NaOH и 0,5% SDS. Концентрацию белка определяли по методу Лоури—Фолина. Для построения калибровочной кривой использовался бычий сывороточный альбумин. Пигменты экстрагировали 90%-ным ацетоном с добавлением $MgCO_3$. Расчет количества хлорофиллов «a», «b» и суммы каротиноидов производили после спектрофотометрирования (СФ–26) по описанным в литературе формулам [40].

Использованные методы статистической и математической обработки данных. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ SPSS 13.0. Опыты проводили в трех–шести биологических и трех аналитических повторностях. Достоверность различий проверяли с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали статистически значимыми при $p \le 0{,}05$, при $0{,}05 < p \le 0{,}1$ констатировали наличие статистической тенденции.

Функции, описывающие изменение содержания пигментов и белка в расчете на клетку *D. primolecta*, были получены следующим образом. Сначала определяли кривую роста плотности культуры. Плотность измеряли в начале эксперимента и в конце, таким

образом, получали набор изменений плотности за время эксперимента. Эти изменения соответствуют средней плотности, которую культура имела в ходе инкубации. Зависимость прироста от плотности выражается уравнением

$$f(D) = \frac{dD}{dt}, \tag{1}$$

где *D*°— клеточная плотность, *t*°— время. Известно, что кривая роста культуры может быть аппроксимирована логистическим уравнением [41]

$$D(i) = \frac{c}{1 + 10^{a-bt}}, \tag{2}$$

где *c* — верхняя асимптота функции, соответствующая максимальной плотности, *a* и *b* — параметры, определяющие форму кривой [42]. При нашем режиме культивирования максимальная плотность культуры составляла 9 млн кл./мл, поэтому примем $c = 9$. Производная этой функции описывается уравнением:

$$\frac{dD}{dt} = f(t) = \frac{-bc \ln 10 \cdot 10^{(a+bx)}}{(1 + 10^{(a+bx)})^2}. \tag{3}$$

Далее из уравнения (2) выразим *t* через *D* и подставим в уравнение (3), получим уравнение функции (1)

$$f(D) = \frac{dD}{dt} = \frac{\left(1 - \frac{c}{D}\right) \cdot \ln 10 \cdot b \cdot D^2}{c}. \tag{4}$$

Данное уравнение описывает зависимость скорости роста культуры от ее плотности. Для определения параметров *a* и *b* был проведен регрессионный анализ методом итераций. При этом начальные значения параметров определяли исходя из того, что начальная плотность культуры равна 0,09 млн кл./мл, конечная (*c*) 9 млн кл./мл, а скорость роста (*dD*/*dt*) культуры в этом случае равна нулю.

Затем рассчитывали кривую зависимости содержания белка и пигментов в культуре в зависимости от времени. Данная кривая имеет два участка: первый — возрастающий и второй — убывающий. Искомая функция представляет собой сумму двух логистических уравнений с общим максимумом, из которой вычитают значение этого максимума. При этом первая функция — неубывающая, а вторая — невозрастающая:

$$M(t) = \frac{c_1}{1 + 10^{(a_1 - b_1 t)}} + c' + \frac{c_2}{1 + 10^{(a_2 + b_2 t)}} - c_1. \tag{5}$$

В этом уравнении *c*1 — максимальная концентрация метаболита, *c*′ — конечная концентрация метаболита, *c*2 — разница между максимальной и конечной концентрациями, коэффициенты *a* и *b* определяют форму кривой. Исходные значения параметров этих логистических кривых определяли с помощью регрессионного анализа. Для этого потребовалось установить значения каждой функции в двух точках. Первая точка — начало культивирования (первые сутки). Вторая точка (общая для двух кривых) — это максимум функции (*c*1). Она достигает его через 17 суток. Третье значение — конечное содержание (*c*′), которого тестируемые метаболиты достигают приблизительно на 28–30-е сутки. Значения параметров приведены в табл. 2. Методом итераций находим функцию, описывающую зависимость содержания белка и пигментов в культуре от времени.

Таблица 2. **Концентрации пигментов и белка в 1 мл культуры на разных сроках культивирования, используемые в качестве параметров в регрессионном анализе**

	1-е сутки	17-е сутки	30-е сутки
Хлорофилл «a», мкг/мл	0,01	3,5	1,0
Хлорофилл «b», мкг/мл	0,0035	1,3	0,35
Каротиноиды, мкг/мл	0,01	2,7	1,0
Белок, мкг/мл	0,7	250	70

Далее определяли зависимость содержания белка и пигментов в клетке и в культуре в зависимости от плотности. Для этого время выразили через плотность из уравнения (2):

$$t = \frac{\lg\left(\frac{c-D}{D}\right) - a}{b} \tag{6}$$

и подставили в уравнение (5). Полученная функция описывает концентрацию пигментов или белка в культуре в зависимости от плотности:

$$M(D) = \frac{c_1}{1 + 10^{\left[a_1 - b_1 \frac{\lg\left(\frac{c-D}{D}\right) - a}{b}\right]}} + c' + \frac{c_2}{1 + 10^{\left[a_2 + b_2 \frac{\lg\left(\frac{c-D}{D}\right) - a}{b}\right]}} - c_1, \tag{7}$$

разделив правую часть уравнения (7) на *D* получим уравнение описывающие количество пигментов или белка в клетке в зависимости от плотности.

Для регрессионного анализа использовали те же исходные значения параметров, что и для нахождения функции содержания метаболитов в культуре в зависимости от времени.

Результаты исследования

Характеристика роста Dunaliella primolecta. Рост плотности культуры описывается логистической функцией (2). После определения параметров при помощи регрессионного анализа уравнение роста культуры *Dunaliella primolecta* (2) принимает следующий вид (рис. 1, *б*)

$$D(t) = \frac{9}{1 + 10^{(2+0{,}138 \cdot t)}}.$$

При изменении плотности культуры меняется скорость ее роста. Этот процесс носит нелинейный характер и описывается уравнением (4), которое после проведения регрессионного анализа имеет вид (рис. 1, *а*)

$$f(D) = \frac{dD}{dt} = \frac{0{,}318 \cdot \left(\frac{9}{x} - 1\right) \cdot x^2}{9}.$$

При росте плотности культуры *D. primolecta* количество белка, хлорофилла «a», «b» и каротиноидов в культуре возрастает, а затем несколько снижается (рис. 2). Также происходит постепенное снижение количества белка и пигментов в расчете на клетку (рис. 3). Снижение количества пигментов и белка в клетках при росте плотности

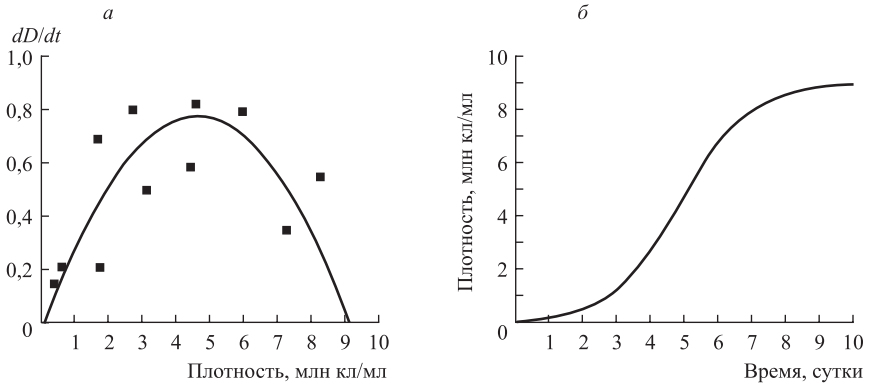


Рис. 1. Изменение скорости роста культуры *D. primolecta* в зависимости от клеточной плотности (*а*). Кривая роста клеточной плотности *D. primolecta*, полученная из функции кривой на рис. 1, *а* (*б*)

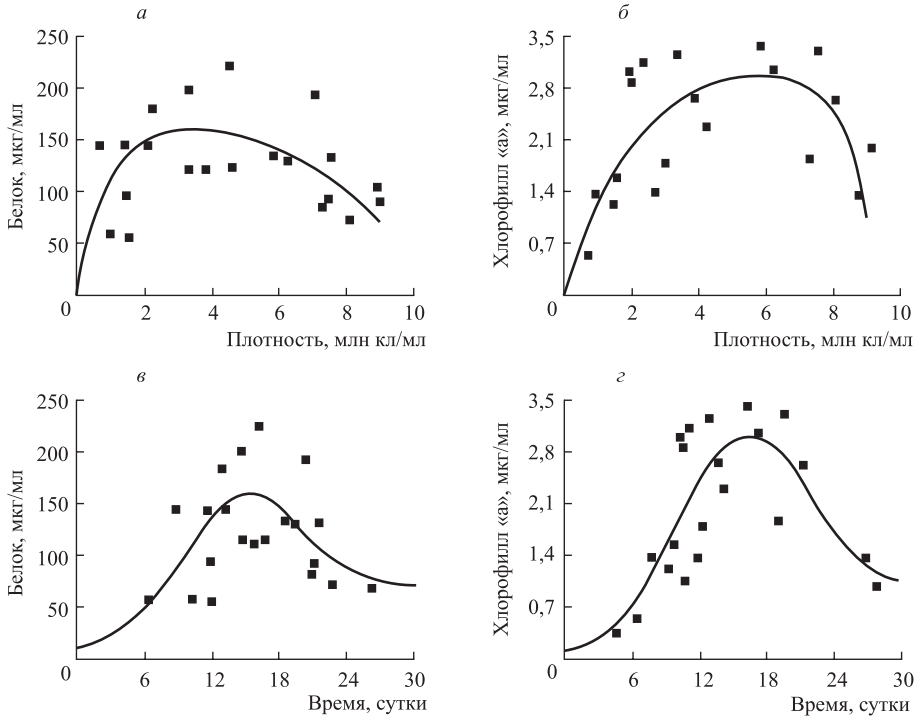


Рис. 2. Динамика содержания белка и пигментов в культуре *D. primolecta*:

Зависимость содержания: *а* — белка от клеточной плотности, *б* — хлорофилла «а» от клеточной плотности, *в* — белка от времени, *г* — хлорофилла «а» от времени.

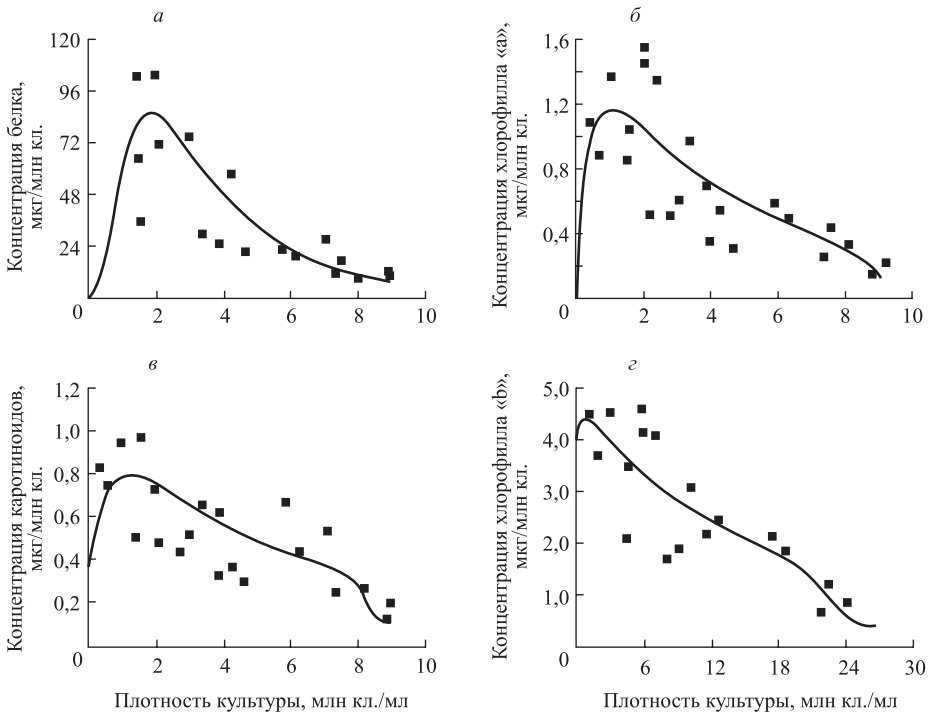


Рис. 3. Зависимость содержания белка и пигментов в клетках *D. primolecta* от плотности культуры

культуры происходит синхронно, что подтверждается корреляционным анализом. Значения коэффициента Пирсона, рассчитанные после приведения зависимости к виду, близкому к линейному, путем логарифмирования, приведены в табл. 3. Можно видеть, что значения коэффициентов Пирсона соответствуют сильной корреляции (> 0,7), а значения коэффициентов значимости подтверждают ее достоверность (< 0,001).

Таблица 3. **Значения коэффициентов корреляции плотности, содержания белка и пигментов в клетках *D. primolecta***

	Статистика	Хлорофилл «a»	Хлорофилл «b»	Каротиноиды	Белок
Плотность	Коэффициент корреляции Пирсона	–0,670	–0,776	–0,764	–0,771
Белок	То же	0,791	0,799	0,804	–

Фотосинтетические пигменты в клетке синтезируются белками-ферментами и входят в состав пигмент-белковых комплексов. Можно предположить, что непосредственной причиной снижения количества пигментов в расчете на клетку является снижение количества белка, а не рост плотности культуры. Для уточнения гипотезы о роли количества белка в синтезе пигментов в клетках был проведен частный корреляционный анализ. Его данные показывают, что при устранении влияния переменной, отражающей содержание белка, связь между количеством белка в клетке и плотностью культуры ста-

новится незначимой. Таким образом, подтверждается гипотеза о ключевой роли белка в определении количества пигментов в клетках (табл. 4).

Таблица 4. **Значения коэффициентов корреляции плотности культуры и пигментов в клетках *D. primolecta* после исключения искажающей переменной, описывающей содержание белка**

	Хлорофилл «a»	Хлорофилл «b»	Каротиноиды
Плотность	–0,272	–0,243	–0,253
Уровень значимости, двусторонний	0,393	0,440	0,428

Для выяснения динамики содержания пигментов и белка в суспензии *D. primolecta* был проведен регрессионный анализ, в результате которого были выведены следующие 12 уравнений (см. рис. 2 и 3):

1) зависимость содержания белка от времени (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{250}{1+10^{(1,35-0,126t)}}+\frac{180}{1+10^{(-3,13+0,167t)}}-180;$$

2) зависимость содержания белка от плотности (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{250}{1+10^{\left(-0,89+\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{180}{1+10^{\left(-0,249-0,986\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-180;$$

3) зависимость содержания белка от плотности (расчет на 1 млн клеток):

$$\left[\frac{250}{1+10^{\left(-1,84+2,59\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{180}{1+10^{\left(-0,24-1,50\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-180\right]\div D;$$

4) зависимость содержания хлорофилла «a» от времени (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{3,5}{1+10^{(1,51-0,156t)}}+\frac{2,5}{1+10^{(-4,03+0,183t)}}-2,5;$$

5) зависимость содержания хлорофилла «a» от плотности (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{3,5}{1+10^{\left(-0,8+1,17\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{2,5}{1+10^{\left(-1,19-1,08\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-2,5;$$

6) зависимость содержания хлорофилла «a» от плотности (расчет на 1 млн клеток):

$$\left[\frac{3,5}{1+10^{\left(-0,96+1,36\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{2,5}{1+10^{\left(-0,898-0,841\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-2,5\right]:D;$$

7) зависимость содержания хлорофилла «b» от времени (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{1,3}{1+10^{(2,57-0,245t)}}+\frac{0,95}{1+10^{(-3,80+0,200t)}}-0,95;$$

8) зависимость содержания хлорофилла «b» от плотности (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{1,3}{1+10^{\left(-0,599+1,08\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{0,95}{1+10^{\left(-1,59-2,31\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-0,95;$$

9) зависимость содержания хлорофилла «b» от плотности (расчет на 1 млн клеток):

$$\left[\frac{1,3}{1+10^{\left(-0,596+1,06\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{0,95}{1+10^{\left(-1,78-2,59\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-0,95\right]:D;$$

10) зависимость содержания каротиноидов от времени (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{2,7}{1+10^{(2,09-0,165t)}}+\frac{1,7}{1+10^{(-16,96+0,734t)}}-1,7;$$

11) зависимость содержания каротиноидов от плотности (расчет на 1 мл суспензии):

$$\frac{2,7}{1+10^{\left(-0,623+1,10\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{1,7}{1+10^{\left(-4,81-4,80\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-1,7;$$

12) зависимость содержания каротиноидов от плотности (расчет на 1 млн клеток):

$$\left[\frac{2,7}{1+10^{\left(-0,85+1,37\lg\frac{9-D}{D}\right)}}+\frac{1,7}{1+10^{\left(-4,35-4,34\lg\frac{9-D}{D}\right)}}-1,7\right]:D.$$

Рост культур D. salina и A. variabilis. В период экспоненциального роста у *D. salina* и *A. variabilis* плотность культур возрастала с 0,5 до 5 млн кл./мл. Характеристики культур *A. variabilis* и *D. salina*, такие как плотность, количественный состав пигментов и содержание белка, приведены в табл. 5. Из табл. 5 видно, что при культивировании не выявлено изменения содержания белка и пигментов в клетках в зависимости от плотности культуры.

Таблица 5. **Характеристики культур микроводорослей в фазе роста**

	Скорость деления клеток в фазе роста, деления/сутки	Хлорофилл «a», мкг/млн кл.	Хлорофилл «b» (мкг/млн кл.)± стандартная ошибка среднего	Каротиноиды (мкг/млн кл.)± стандартная ошибка среднего	Белок (мкг/млн кл.)± стандартная ошибка среднего
D. salina	0,53±0,145	0,407±0,011	0,635±0,059	1,41±0,107	54,42±11,47
A. variabilis	0,58±0,017	0,239±0,022	Не обнаружено	0,094±0,016	18,0±1,73

Исследование влияния органических субстратов на динамику плотности культур микроводорослей. Влияние органических веществ на динамику клеточной плотности анализировали для *D. primolecta* в фазах роста и стационарной, а для *D. salina* и *A. variabilis* — в фазе роста. Полученные результаты свидетельствуют, что проанализированные органические вещества не оказывают влияния на рост культуры *D. primolecta* независимо от фазы ее роста (рис. 4), тогда как *D. salina* на стадии экспоненциального роста увеличивает скорость роста плотности культуры в 3 раза при внесении глюкозы (см. рис. 4). Данный эффект отсутствует при действии глицерина и этанола. Растущие

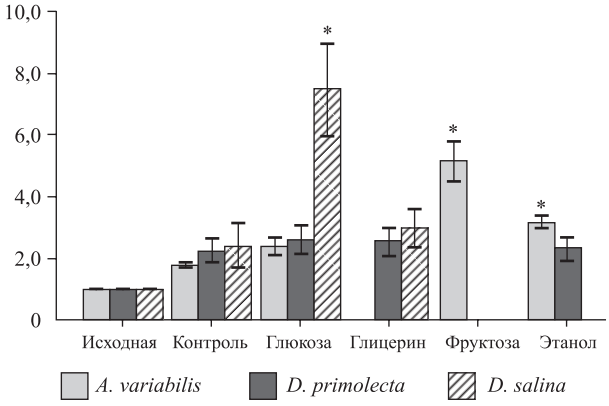


Рис. 4. Изменение клеточной плотности растущих культур водорослей, находившихся при постоянном освещении за трое суток при добавлении органических веществ

За единицу принято значение плотности культуры в начале эксперимента; звездочкой отмечены достоверные различия; интервалами показано стандартное отклонение (то же для рис. 5).

культуры *A. variabilis* увеличивают скорость деления клеток приблизительно в 2,5 раза при добавлении фруктозы. Глюкоза и этанол оказывают значительно более слабый эффект (см. рис. 4). Ни один из исследованных субстратов не был способен поддерживать гетеротрофный рост культур всех трех видов водорослей.

Влияние органических субстратов на содержание белка. Увеличение числа клеток в культуре — не единственный процесс, обусловливающий накопление биомассы под воздействием используемых субстратов. В ряде случаев метаболиты стимулируют синтетическую активность клеток, не вызывая увеличения скорости деления. Индикатором синтетической активности клеток может служить содержание белка. На рис. 5 показано, каким образом изменялось содержание белка в клетках стационарной культуры *Dunaliella primolecta* при постоянном освещении. Можно видеть, что глюкоза способ-

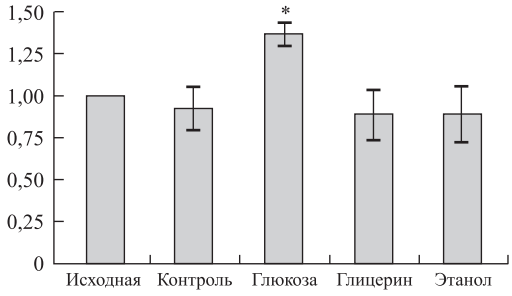


Рис. 5. Изменение количества белка в клетках стационарной культуры *D. primolecta*, находящейся при постоянном освещении в течение трех суток, после добавления органических веществ

ствует большему (на 25%) накоплению белка в клетках. По результатам статистического анализа (ANOVA) различия существуют лишь на уровне тенденции (значимость 0,08), а из апостериорных тестов лишь LSD (многократный *t*-тест без *альфа*-коррекции) дает соответствующую группировку. В фазе интенсивного роста, а также при выращивании культур в темноте данный эффект не выявлен.

У *D. salina* изменения содержания белка в клетках при добавлении глюкозы не выявлено.

Добавление глюкозы, фруктозы и этанола не приводит к изменению содержания белка в клетках *Anabaena variabilis,* независимо от условий освещения.

Обсуждение результатов исследования

В ходе проведенного исследования показано, что содержание белка и пигментов в клетках нелинейно зависит от времени культивирования и плотности исследованных культур *Dunaliella primolecta*. Зависимость содержания пигментов и белка в клетках от времени и плотности можно объяснить различиями в метаболизме клеток, в том числе интенсивности синтеза белка на разных стадиях развития культуры. Рост культуры можно разделить на три фазы. В начале роста скорость деления клеток невелика, и в них накапливаются метаболиты. По-видимому, это связано с тем, что после посева культуры индукция деления происходит медленнее, чем активация синтеза белка и пигментов, так как для начала деления клеток необходим запуск метаболических и сигнальных систем, а также накопление достаточного количества метаболитов. Тем самым синтез белка активируется и достигает максимума быстрее, чем деление клеток. Затем культура плавно переходит в стадию экспоненциального роста. На этой стадии количество белка и пигментов в расчете на клетку падает, по причине отставания скорости синтеза белка от скорости деления. Аналогичное явление было обнаружено ранее у других водорослей. Например, при добавлении этанола в среду культивирования *E. gracilis* происходит увеличение скорости роста клеточной плотности, а количество белка в расчете на клетку снижается [22]. Далее культура переходит к стационарной фазе, при этом скорость деления клеток снижается, незадолго до конца экспоненциальной фазы количество белка и пигментов в расчете на объем культуры также начинает снижаться (см. рис. 1, 2, 3).

Репрессия синтетических процессов и начало снижения количества метаболитов в клетках предшествует переходу культуры в стационарную фазу. При переходе к стационарной фазе количество белка и пигментов падает приблизительно в три раза, что, по-видимому, связано со снижением интенсивности синтетических процессов.

Внесение экзогенных органических веществ, утилизируемых клетками водорослей в качестве источников энергии и углерода, вызывает изменение скорости накопления биомассы и деления клеток различных водорослей [14–19, 43–45]. Однако нами установлено, что добавление глюкозы, глицерина или этанола к клеткам *D. primolecta* не вызывает изменения плотности культуры ни на стадии экспоненциального роста, ни в стационарной фазе развития вне зависимости от наличия освещения. Данный факт свидетельствует о неспособности этого штамма к эффективному миксотрофному росту. В то же время внесение глюкозы в среду растущей культуры *D. salina* приводит к увеличению скорости роста, что указывает на наличие межвидовых различий в реакциях на добавление подобного метаболита. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными [15] о реакциях представителей рода *Dunaliella* на внесение органических соединений. Выявленные межвидовые различия могут быть обусловлены трофической специализацией разных видов. Можно предположить, что *D. primolecta* является более специализированным автотрофом, по сравнению с *D. salina*, способной утилизировать экзогенную глюкозу и перестраивать свой метаболизм для обеспечения более интенсивного размножения при миксотрофном питании.

В то же время нельзя полностью отрицать способность к миксотрофному питанию у *D. primolecta*. В ряде случаев клеткам требуется длительный адаптационный период для перестройки метаболизма, необходимой при миксотрофном или гетеротрофном питании. По литературным данным глюкоза положительно влияет на скорость роста *Platymonas subcordiformis* только после 48-часовой лаг-фазы [12]. Добавление глюкозы

в среду выращивания цианобактерии *Nostoc linckia* вызывало интенсификацию деления лишь через четыре дня [37]. Переход красной водоросли *Galdieria sulphuraria* от автотрофного роста к гетеротрофному происходит после лаг-фазы длительностью 45 дней. Продолжительность лаг-фазы прямо пропорциональна длительности предварительного фотоавтотрофного культивирования [46]. Таким образом, отсутствие заметного эффекта глюкозы на *D. primolecta* в нашем исследовании может объясняться недостаточной продолжительностью воздействия.

На незначительную способность *D. primolecta* утилизировать экзогенную органику указывает увеличение количества белка в клетках при добавлении глюкозы в культуру, находящуюся в состоянии, близком к стационарному. В фазе активного роста подобной реакции не выявлено. Возможно, эта способность связана с различиями в физиологическом состоянии клеток на разных стадиях развития культуры, а следовательно, с различиями в содержании белка в клетках. Данный эффект не наблюдался при выращивании клеток в темноте, что согласуется с тем, что данному организму, как специализированному автотрофу, необходим свет для поглощения органики и синтеза белка. У типичных миксотрофов снижение интенсивности фотоавтотрофного питания индуцирует усвоение экзогенной органики [13, 27, 47–50]. В то же время у *D. salina* значимого изменения содержания белка в расчете на клетку при добавлении органических веществ не выявлено.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют о положительном влиянии органических веществ на рост культур таких цианобактерий, как *Synechococcus* [51], *Spirulina platensis* [36, 38, 52], *Nostock muscorum, Anacystis nidulans* [53, 54]. В нашем исследовании при добавлении фруктозы в среду культивирования *Anabaena variabilis* происходило значительное увеличение скорости роста культуры, что согласуется с результатами других исследований [39, 53, 54]. Сходная реакция была выявлена при добавлении этанола, что указывает на способность утилизации анабеной этих двух субстратов и увеличение продуктивности цианобактерии. Отсутствие положительного действия глюкозы на рост культуры анабены согласуется с данными о неспособности *A. variabilis* утилизировать глюкозу и сахарозу при культивировании на среде, содержащей нитраты в качестве источника азота [53, 55]. Ни один из использованных нами субстратов не был способен поддерживать рост цианобактерии в темноте. Известно, что для некоторых штаммов *A. variabilis* описана возможность гетеротрофного культивирования, однако большинство штаммов анабены неспособны к росту в темноте [56]. Торможение или остановка ростовых процессов в отсутствии освещения описаны и для других цианобактерий. При помещении плектонемы в гетеротрофные условия происходит восьмикратное падение скорости роста [57], а *Agmenellum quadroplicatum*, метаболизирующий глицерин в качестве единственного источника углерода, не способен к росту в темноте [34, 58].

Заключение

Таким образом, у представителей рода *Dunaliella* выявлены межвидовые различия в реакциях на добавление органических веществ. *D. primolecta* не увеличивает скорости роста при добавлении органических субстратов, что свойственно специализированным автотрофам. Скорость роста культур *D. salina* и *A. variabilis* повышается при добавлении глюкозы и фруктозы соответственно, что сближает эти организмы с миксотрофами из

различных групп водорослей. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что способность к увеличению скорости роста при миксотрофном питании зависит в большей степени от частных особенностей метаболизма, чем от уровня организации растительной клетки. Исследованные нами водоросли не способны к гетеротрофному росту с использованием органических субстратов, что говорит о ведущей роли фотосинтетических процессов (облигатная фототрофия).

Работа частично поддержана из средств темы гос. регистр. 01201052819 и РФФИ (грант № 10-04-01035-а).

Литература

1. *Santín-Montanyá I., Sandín-España P., García Baudín J. M., Coll-Morales J.* Optimal growth of *Dunaliella primolecta* in axenic conditions to assay herbicides // Chemosphere 2007. Vol. 66. P. 1315–1322.

2. *Dagenais-Bellefeuille S., Bertomeu T., Morse D. J.* S-phase and M-phase timing are under independent circadian control in the dinoflagellate Lingulodinium // Biol. Rhythms. 2008. Vol. 23. P. 400–408.

3. *Ильяш Л. В.* Взаимосвязь фотосинтетической активности и ассимиляции органических веществ у морских миксотрофных планктонных водорослей — проявление разных стратегий метаболизма // Журн. общ. биол. 2002. Т. 63, № 5. С. 407–417.

4. *Jones H., Cockell C. S, Goodson C., Price N.* et al. Experiments on mixotrophic protists and catastrophic darkness // Astrobiology. 2009. Vol. 9. P. 563–571.

5. *Hayward J.* Studies on the growth of *Phaeodactylum tricornutum*. II. The effect of organic substance on growth // Physiologia Pl. 1968. Vol. 21. P. 100–108.

6. *Darley M., Ohlman T. C., Wimpee B. B.* Utilization of dissolved organic carbon by natural population of epibenthic salt marsh diatoms // J. Phycol. 1979. Vol. 15. P. 1–5.

7. *Laliberte G., de la Noüe J.* Auto-hetero- and mixotrophic growth of *Chlamydomonas* humícola (Chlorophyceae) on acetate // J. Phycol. 1993. Vol. 29. P. 612–620.

8. *Chu W. L., Phang S. M., Goh S. H.* Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow // J. Appl. Phycol. 1996. Vol. 8. P. 389–396.

9. *Hata N., Ogbonna J. C., Hasegawa Y.* et al. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic–photoautotrophic culture // J. Appl. Phycol. 2001. Vol. 13. P. 395–402.

10. *Chu W. L., Phang S. M., Goh S. H.* Influence of carbon source on growth, biochemical composition and pigmentation of Ankistrodesmus convolutus // J. Appl. Phycol. 1995. Vol. 7. P. 59–64.

11. *Ellis R., Spooner T., Yakulis R.* Regulation of Chlorophyll Synthesis in the Green Alga Golenkinia // Plant Physiol. 1975. Vol. 55. P. 791–795.

12. *Xie J., Zhang Y., Li Y., Wang Y.* Mixotrophic cultivation of *Platymonas subcordiformis* // J. Appl. Phycol. 2001. Vol. 13. P. 343–347.

13. *Bouarab L., Dauta A., Loudiki M.* Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration // Water Res. 2004. Vol. 38. P. 2706–2712.

14. *Orosa M. D., Franqueira A. C., Abalde J.* Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth // Biotechnol. Lett. 2001. Vol. 23. P. 373–378.

15. *Ukeles R., Rose W. E.* Observations on Organic Carbon Utilization by Photosynthetic Marine Microalgae // Mar. Biol. 1976. Vol. 37. P. 11–28.

16. *Ceron Garcıa M. C., Fernandez Sevilla J. M., Acien Fernandez F. G.* et al. Mixotrophic growth of Phaeodactylum tricornutum on glycerol: growth rate and fatty acid profile // J. Appl. Phycol. 2000. Vol. 12. P. 239–248.

17. *Higashiyama T.* "Gigantism" of Chlorella vulgaris I. Relation of Gigantism to cell growth and division // Plant and Cell Physiology 1967. Vol. 8. P. 567–579.

18. *Ahmad I., Hellebust J. A.* Regulation of Chloroplast Development by Nitrogen Source and Growth Conditions in a *Chlorella protothecoides* Strain1 // Plant Physiol. 1990. Vol. 94. P. 944–949.

19. *Martinez F., Orus M. I.* Interactions between Glucose and Inorganic Carbon Metabolism in *Chlorella vulgaris* Strain UAM 1011 // Plant Physiol. 1991. Vol. 95. P. 1150–1155.

20. *Munir I., Nakazawa M., Harano K., Yamaji R.* et al. Occurrence of a novel NADP(+)-linked alcohol dehydrogenase in Euglena gracilis // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2002. Vol. 132 P. 535–540

21. *Palma-Gutiérrez H. N., Rodríguez-Zavala J. S., Jasso-Chávez R.* et al. Gene cloning and biochemical characterization of an alcohol dehydrogenase from *Euglena gracilis* // Eukaryot. Microbiol. 2008. Vol. 55. P. 554–561.

22. *Rodriguez–Zavala J. S., Ortiz-Cruz M. A., Moreno-Sanchez R.* Characterization of an Aldehyde Dehydrogenase from Euglena gracilis // J. Eukaryot. Microbiol. 2006. Vol. 53 P. 36–42.

23. *Julistiono H., Briand J.* Microsomal ethanol-oxidizing system in *Euglena gracilis*. Similarities between Euglena and mammalian cell systems // Comp. Biochem. Physiol. B. 1992. Vol. 102. P. 747–755.

24. *Cook J. R., Heinrich B.* Glucose vs. acetate metabolism in Euglena // J. Protozool. 1965. Vol. 12. P. 581–584.

25. *Nicolas P., Freyssinet G., Nigon V*. Effect of Light on Glucose Utilization by *Euglena gracilis* // Plant Physiol. 1980. Vol. 65. P. 631–634.

26. *Ono K., Kawanaka Y., Izumi Y., Inui H.* et al. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis* // J. Biochem. 1995. Vol. 117. P. 1178–1182.

27. *Ogbonna J. C., Ichige E., Tanaka H.* Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of Euglena gracilis // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. Vol. 58. P. 532–538.

28. *Heifetz P. B., Forster B. C., Osmond B.* et al. Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. P. 1439–1445.

29. *Oren A.* A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005 // Saline Systems. 2005. Vol. 1, N 2. P. 14.

30. *Wegmann K.* Osmotic regulation of photosynthetic glycerol production in Dunaliella // Biochim. Biophys. Acta. 1971. Vol. 234. P. 317–323.

31. *Chen H., Jiang J. G.* Osmotic responses of *Dunaliella* to the changes of salinity // J. Cell Physiol. 2009 Vol. 219. P. 251–258.

32. *Ben-Amotz A., Avron M.* The Role of Glycerol in the Osmotic Regulation of the Halophilic Alga *Dunaliella parva* // Plant Physiol. 1973 Vol. 51. P. 875–878.

33. *Enhuber G., Gimmler H.* The glycerol permeability of the plasmalemma of the halotolerant green alga *Dunaliella parva* (Volvocales) // J. Phycol. 1980. Vol. 16. P. 524–534.

34. *Ingram L. O., Van Baalen C., Calder J. A.* Role of reduced exogenous organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria (algae): photoheterotrophic growth of an "autotrophic" blue-green bacterium // J. Bacteriol. 1973. Vol. 114. P. 701–705.

35. *White A. W., Shilo M.* Heterotrophic growth of the filamentous blue-green alga *Plectonema boryanum* // Arch Microbiol. 1975. Vol. 102. P. 123–127.

36. *Chen F., Zhang Y.* High cell density mixotrophic culture of Spirulina platensis on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system // Enzyme Microb. Technol. 1997. Vol. 20. P. 221–224.

37. *Sanders R. W., Porter K. G., Caron D. A.* Relationship between phototrophy and phagotrophy in the mixotrophic chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis* // Microb. Ecol. 1990. Vol. 19. P. 97–109.

38. *Mykhaylenko N. F., Syvash O. O., Tupik N. D., Zolotoreva O. K.* Exogenous hexoses cause quantitative changes of pigment and glycerolipid composition in filamentous cyanobacteria // Photosyntetica. 2004. Vol. 42. P. 105–110.

39. *Haury J. F., Spiller H.* Fructose uptake and influence on growth of and nitrogen fixation by *Anabaena variabilis* // J. Bacteriol. 1981. Vol. 147. P. 227–235.

40. *Jeffrey S. W., Humphrey G. F.* New spectrophotometric equations for determining chlorophylls «a»,

«b», «c1» and «c2» in higher plants, algae and natural phytoplankton // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1975. Vol. 167. P. 191–194.

41. *Гуревич К., Варфоломеев С.* Биокинетика М.: Гранд-Фаир, издательская группа, 1999. 720 с.

42. *Зайцев Г.Н.* Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1973. 256 с.

43. *Jolley E. T., Jones A. K.* A Description of Glucose Uptake in *Navicula pelliculosa* (Breb) Hilse Including a Brief Comparison with an Associated *Flavobacterium sp.* // Arch. Microbiol. 1976. Vol. 109. P. 127–133.

44. *Lewitus A. J., Caron D. A.* Physiological responses of pytophlagellates to dissolved organic substrate addition 1. Dominant role of heterotrophic nutrition in *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) // Plant Cell Physiol. 1991 Vol. 32. P. 671–680.

45. *Li A., Stoecker D. K., Adolf J. E.* Feeding, pigmentation, photosynthesis and growth of the mixotrophic dinoflagellate *Gyrodinium galatheanum* // Aquat. Micro. Ecol. 1999. Vol. 19. P. 163–176.

46. *Gross W., Schnarrenberger C.* Heterotrophic Growth of Two Strains of the Acido-Thermophilic Red Alga *Galdieria sulphuraria* // Plant Cell Physiol. 1995. Vol. 36. P. 633–638.

47. *Syrett P. J., Bocks S. M., Merrett M. J.* The assimilation of acetate by *Chlorella vulgaris* // J. Exp. Bot. 1966. Vol. 15. P. 35–47.

48. *Tanner W.* Light-driven active uptake of 3-O-methylglucose via an inducible hexose uptake system of *Chlorella* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1969. Vol. 36. P. 278–283.

49. *Bennet E. M., Hobbie E. J.* The uptake of glucose by Chlamidomonas sp. // J. Phycol. Vol. 8. P. 392–398.

50. *Haas D., Tanner W.* Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris* // Plant Physiol. 1973 Vol. 53. P. 14–20.

51. *Kang R., Wang J., Shi D., Cong W*. et al. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus sp.* // Biotechnol. Lett. 2004. Vol. 26. P. 1429–1432.

52. *Vonshak A.* Mixotrophic growth modifies the respose of Spirulina (Arthrispira platensis (Cyanobacteria) cells to light // J. Phycol. Vol. 36. P. 2000.

53. *Kratz W. A., Myers J.* Nutrition and growth of several blue-green algae // Amer. J. Bot. 1955. Vol. 42. P. 282–287.

54. *Kratz W. A., Myers. J.* Photosynthesis and respiration of three blue-green algae // Plant Physiol. 1955. Vol. 30. P. 275–280.

55. *Pearce J., Carr N. G.* The incorporation and metabolism of glucose by *Anabaena variabilis* // J. Gen. Microbiol. 1969. Vol. 54. P. 451–462.

56. *Mannan R. M., Pakrasi H. B.* Dark Heterotrophic Growth Conditions Result in an Increase in the Content of Photosystem II Units in the Filamentous Cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 2941 3 // Plant Physiol. 1993. Vol. 103. P. 971–977.

57. *Raboy B., Padan E., Shilo M.* Heterotrophic capacities of Plectonema boyanum // Arch. Microbiol. 1976. Vol. 110. P. 77–85.

58. *Van Baalen C., Hoare D. S., Brandt E.* Heterotrophic growth of blue-green algae in dim light // J. Bacteriol. 1971. Vol. 105 P. 685–689.

Статья поступила в редакцию 20 декабря 2010 г.