

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ

УДК 581.526.325.2

ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ НА СООТНОШЕНИЕ В ИХ КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНЫХ ПИГМЕНТОВ

Н.П. ДМИТРОВИЧ, Т.В. КОЗЛОВА

*Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь*

Введение. Водоросли – богатейший источник белковых веществ, витаминов, микроэлементов и других биологически активных веществ. Они участвуют в процессах формирования гидробиоценозов, влияют на органолептические показатели воды и в целом на ее качество. Основным достоинством водорослей является физиолого–биохимическое разнообразие их пигментов и лабильность их химического состава, что позволяет осуществлять управляемый биосинтез ценных химических природных соединений [1]. Выделяя в окружающую среду различные биологически активные вещества, водоросли оказывают регуляторное воздействие на другие организмы.

Данные о составе, концентрации и соотношении растительных пигментов в клетках водорослей широко используются гидробиологами при различных аспектах изучения фитопланктона [2]. Хлорофилл, находящийся в фотосинтетических мембранах, служит природным датчиком состояния клеток водорослей и высших растений. Периодам интенсивного развития водорослей соответствует увеличение концентрации их пигментов. Это дает возможность судить о продуктивности фитопланктона по концентрации хлорофилла в водорослях. Использование такого метода значительно упрощает определение продуктивности фитопланктона по биомассе, подсчет которой занимает много времени [3].

Пигментный состав планктонных водорослей характеризуется большим разнообразием. Помимо обязательного для всех хлорофилла *a*, по концентрации которого можно определять общую биомассу и продукцию фитопланктона, у них имеется большое число других пигментов, из которых многие присущи только определенному виду водорослей. К ним относятся хлорофилл *c* и фукоксантин диатомовых и перидиниевых, билихромопротеиды сине-зеленых и фикобилины красных водорослей. Для того чтобы определить количество хлорофилла внутриклеточный хлорофилл сначала должен быть извлечен. Так как хлорофилл обладает высокой реакционной способностью, показатель концентрации определенного вида хлорофилла в водорослях зависит от образования продуктов распада. Продукты распада хлорофилла образуются тогда, когда их молекулы подвергаются воздействию избыточного света, кислорода воздуха, высоких температур и кислот или оснований. Традиционный метод для количественного определения хлорофилла и других пигментов – это приготовление экстракта для спектрофотометрического анализа. Концентрацию различных соединений хлорофилла и других пигментов определяют путем измерения оптической плотности образца при конкретной длине волны и используют стандартные уравнения для расчета концентрации пигментов. Однако было обнаружено, что этот метод иногда может давать неточные результаты, т.к. как поглощение и излучение полос других пигментов пересекаются с хлорофиллом [4].

Также немаловажное значение для определения физиологического состояния клеток фитопланктона имеет определение соотношения общих каротиноидов к хлорофиллу *a* (C_k/C_{chl}) [5, 6]. Каротиноиды являются более стабильным компонентом пигментной системы водорослей, чем хлорофилл *a*. Усиление в клетках процессов каротиногенеза или разрушения хлорофилла свидетельствует о замедлении уровня метаболизма и ухудшении физиологического состояния водорослей [2]. Этим объясняется то, что при старении популяций фитопланктона и при неблагоприятных воздействиях на них факторов среды, способствующих деструкции хлорофилла *a*, величина отношения (C_k/C_{chl}) возрастает. Отношение C_k/C_{chl} при разных условиях может колебаться в достаточно широких пределах. Однако среднее его значение для отдельных видов морского и пресноводного фитопланктона варьирует слабо и находится в основном в границах 0,28 – 0,40 [7]. Высокие средние величины отношения C_k/C_{chl} (около 1) характерны для фитопланктона прудов [8], мелководных водохранилищ и озёр [9]. Изучение отношения C_k/C_{chl} очень полезно при разработке показателей эффективности функционирования фитопланктона различного видового состава. Как правило, низкие величины рассматриваемого соотношения соответствуют диатомовому фитопланктону, а

высокие – преимущественно фитопланктону из динофлагеллат и синезеленых [5]. Следует отметить также, что количественное соотношение различных групп пигментов в фотосинтетическом аппарате водорослей напрямую влияет на их фотосинтетическую активность, а, следовательно, и на продуктивность фотосинтеза и последующий рост биомассы.

Методика и объекты исследования. Настоящее исследование проводилось с целью анализа физиологического состояния разных популяций водорослей. Все они имели различный жизненный цикл, уровень метаболизма и требования к факторам окружающей среды. В эксперименте были исследованы 14 видов и/или штаммов микроводорослей отдела Зелёные водоросли (*Chlorophyta*), классов *Trebouxiophyceae*, *Chlorophyceae*, и *Ulvophyceae*. Культивирование производили в двухлитровых колончатых биореакторах объемом 2 дм³ при постоянном барботаже воздухом, концентрация углекислого газа в котором составляла 2%. Для исследований использовали лучшую из трёх питательных сред, определенную для каждой микроводоросли на предыдущем этапе ее выращивания во встряхиваемых колбах. Интенсивность освещения поддерживалась на уровне 200 – 205 $\mu\text{моль/м}^2\cdot\text{с}$ на протяжении всего периода культивирования. Продолжительность выращивания микроводорослей в колончатых биореакторах составила 14 дней.

На протяжении всего периода культивирования измерялась концентрация пигментов в водорослях спектрофотометрическим методом. Для этого отбирали 1 г суспензии из каждого биореактора и измеряли концентрацию пигментов по методу Dere и др. с формулами для метанола в качестве растворителя [10]:

$$\text{Chl } a = 15,65 \cdot A_{666} - 7,340 \cdot A_{653};$$

$$\text{Chl } b = 27,05 \cdot A_{653} - 11,21 \cdot A_{666};$$

$$\text{Car} = (1000 \cdot A_{470} - 2,860 \cdot \text{Chl } a - 129,2 \cdot \text{Chl } b) / 245;$$

где Chl *a* – концентрация хлорофилла *a*, Chl *b* – концентрация хлорофилла *b*, Car – концентрация каротиноидов, A_{666} – абсорбция при длине волны 666 нм, A_{653} – абсорбция при длине волны 653 нм, A_{470} – абсорбция при длине волны 470 нм [10].

На основании полученных данных были рассчитаны значения жёлто–зеленого индекса как отношение концентрации каротиноидов к концентрации хлорофилла *a* (E_{470}/E_{666}). Количественное содержание каротиноидов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии наравне со спектрофотометрическим методом в конце процесса культивирования перед определением общего выхода биомассы (урожайности водоросли).

Результаты и их обсуждение. Отношения оптических плотностей экстрактов, косвенно отражающие соотношения концентраций пигментов, могут служить показателями физиологического состояния, структуры и качественного разнообразия фитопланктонного сообщества. В данном исследовании был использован индекс E_{470}/E_{666} , который характеризует соотношение общих каротиноидов и хлорофилла *a*. Полученные значения жёлто–зелёного индекса, хлорофилла *a* и каротиноидов приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Общее содержание пигментов и значение жёлто–зелёного индекса

Названия видов и штаммов водорослей	Содержание хлорофилла <i>a</i> , мкг/1гсм (грамм сырой массы)	Содержание каротиноидов, мкг/1гсм (грамм сырой массы)	Значение жёлто–зелёного индекса, $C_K/C_{ХЛ}$
Сос	0,0083	0,0056	0,6719
14–7	0,1765	0,1277	0,7236
Psд	0,1083	0,1113	1,0274
S–20	0,0042	0,0120	2,8822
14–10	0,0240	0,0403	1,6805
Chr	0,0323	0,0744	2,3062
S–25	0,0244	0,0561	2,2933
15–6	0,0978	0,0997	1,0201
Mur	0,1609	0,1420	0,8829
Bra	0,0042	0,0099	2,3910
Sti	0,1369	0,0834	0,6091
Pse	0,2125	0,1534	0,7222
Des	0,0765	0,0567	0,7416
Chl	0,4374	0,2754	0,6297

Принято считать, что повышение данного индекса свидетельствует об ухудшении физиологического состояния и «старения» фитопланктона, а также увеличении его пигментного разнообразия [11]. Полученные в ходе исследования высокие средние величины жёлто–зелёного индекса (больше 1) для некоторых видов микроводорослей свидетельствуют об ухудшении их физиологического состояния к концу процесса культивирования, что в свою очередь может быть связано с более интенсивным ростом и обменом веществ, в сравнении с другими водорослями. Также следует отметить, что преждевременное «старение» культуры может негативно сказываться на процессе накопления в микроводорослях питательных веществ, в том числе и каротиноидов.

При анализе результатов эксперимента была выявлена зависимость между интенсивностью процесса накопления каротиноидов и физиологическим состоянием микроводорослей в конце процесса культивирования. Для этого значение жёлто–зелёного индекса, приведенного выше, сравнивали с содержанием каротиноидов, определенных двумя методами: спектрофотометрическим методом и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Рассчитанные коэффициенты корреляции показали, что зависимость между содержанием каротиноидов и значением жёлто–зелёного индекса была обратно пропорциональна, и их значения составили: $r=-0,542$ для метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и $r=-0,601$ для спектрофотометрического метода. Полученные значения коэффициентов корреляции свидетельствуют о средней и высокой взаимной зависимости изученных показателей соответственно.

Также в ходе проведения исследований сравнивали эффективность использования двух различных методов определения количественного содержания каротиноидов в клетках микроводорослей: спектрофотометрического и ВЭЖХ метода. Для сравнения рассчитывали коэффициент корреляции. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Количественное содержание каротиноидов в клетках микроводорослей

Названия видов и штаммов водорослей	Содержание каротиноидов, мг/1г сух. биомассы	
	Спектрофотометрический метод	Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии
Coc	0,3460	1,6725
14–7	2,0895	6,3361
Psd	6,6949	41,9907
S–20	0,2689	0,6952
14–10	0,6887	4,4641
Chr	1,0805	7,0824
S–25	1,7104	1,7975
15–6	7,5434	76,4425
Mur	5,0125	32,9381
Bra	4,5990	15,9108
Sti	8,4472	41,3261
Pse	6,6672	35,1461
Des	9,3555	26,6813
Chl	9,4746	64,8694

Была выявлена прямо пропорциональная зависимость между использованными для определения количественного содержания каротиноидов спектрофотометрическим и ВЭЖХ методами. Рассчитанный коэффициент корреляции был равен $r=0,846$, что свидетельствует о возможной взаимной заменимости методов, что позволяет, в свою очередь, выбрать наиболее приемлемый из них для проведения исследований.

Выводы

1. Анализ проведенных исследований показал наличие обратно пропорциональной зависимости между физиологическим состоянием водорослей в конце процесса их культивирования и уровнем накопления в них каротиноидов. Полученные результаты объясняются тем, что большинство водорослей в конце процесса культивирования находились в хорошем физиологическом состоянии и в фазе экспоненциального роста. Это подтверждается невысокими количественными значениями жёлто–зелёного индекса.

2. Исследования показали, что между двумя методами определения содержания каротиноидов в водорослях существует пропорциональная зависимость. На основании этого можно рекомендовать для исследований спектрофотометрический метод как менее трудоёмкий и не требующий дорогостоящего оборудования.

3. Установлено, что определение показателя жёлто–зелёного индекса является немаловажным аспектом при культивировании микроводорослей. Это позволяет проводить своевременный мониторинг их роста и развития, а при необходимости и корректировать данный процесс для получения оптимального результата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Георгицина, К.А. Водоросли– продуценты биоорганических соединений / К.А. Георгицина // Pontus Euxinus 2011: тезисы VII Междунар. науч.–практ. конф. по проблемам водных экосистем, посвящённой 140–летию Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины, Севастополь, 24–27 мая 2011 г. / ЭКОСИ–Гидрофизика, 2011. – С. 66–67.

2. Kozlov, A. Influence of the fulfilled beer yeast on the level of benthos in maturing ponds at the beginning of piscicultural season / A. Kozlov // Pond Aquaculture in Central and Eastern Europe in the 21st Century: Handbook of abstracts. – Vodnany, Czech Repub, May 2–4. – 2001. – P. 16.

3. Джулай, А.А. Содержание хлорофилла а и поглощение света фитопланктоном в Севастопольской бухте (2009–2010 гг.) / А.А. Джулай // Pontus Euxinus 2011: тезисы VII Междунар. науч.–практ. конф. по проблемам водных экосистем, посвящённой 140–летию Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины, Севастополь, 24–27 мая 2011 г. / ЭКОСИ–Гидрофизика, 2011. – С. 97–98.

4. Hosikian, A. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects / A. Hosikian, S. Lim, R. Halim, M. K. Danquah // International journal of chemical engineering. – 2010. – P. 1–11.

5. Догадина, Т.В. Десмидиевые водоросли сточных вод / Т.В. Догадина // Науч. докл. высшей школы. Сер. Биол. науки. – 1972 б. – № 7. – С. 76–81.

6. Елизарова, В.А. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне водоёмов разного типа: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.18 / В.А. Елизарова; Институт биологии внутренних вод АН СССР. – Москва, 1975. – 24 с.

7. Минаев, О.В. Выращивание двухлеток судака в условиях карповых хозяйств II зоны рыбоводства / О.В. Минаев // Молодёжь в науке – 2011: материалы Междунар. науч. конф. молодых учёных, Минск, 25–29 апреля 2011 г. / Нац. акад. наук Беларуси. Совет молодых учёных НАН Беларуси; редкол. В.Г. Гусаков (гл. ред.), И.М. Богдевич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 106–112.

8. Столович, В.Н. Комбинированные (интегрированные) рыбоводные хозяйства / В.Н. Столович // Аквакультура. Ресурсосбережение в товарном рыбоводстве. Интегрированное рыбоводство. – Минск, 1999. – С. 57–75.

9. Елизарова, В.А. Содержание фотосинтетических пигментов в единице биомассы фитопланктона / В.А. Елизарова // Труды ин–та биол. внутр. вод. – Л., 1974. – Вып. 28 (31). – С. 46–64.

10. Dere S., Guenes T., Sivaci R. Spectrophotometric determination of chlorophyll – A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Tr. J. of Botany. 22: 13–17 (1998)

11. Бульон, В.В. Соотношение между первичной продукцией и рыбопродуктивностью водоёмов / В.В. Бульон, Г.Г. Винберг // Основы изучения водных экосистем. – Л., 1981. – С. 5–10.

INFLUENCE OF PHYSIOLOGICAL CONDITION OF MICROALGAE ON RELATIONS OF VARIOUS PIGMENTS IN THEIR CELLS

N.P. DMITROVICH, T.V. KOZLOVA

Summary

It was investigated the effect of the physiological condition of microalgae on the accumulation of various pigments in them. To compare the effectiveness of different methods for determining the quantitative content of carotenoids in algae cells was also carried out.

Key words: algae, physiological condition, chlorophyll, carotenoids, yellow-green index, environmental conditions.

© Дмитрийч Н.П., Козлова Т.В.
Поступила в редакцию 29 января 2015г.