

УДК 579:222

*С.А. Джокебаева, Т.А. Карпенюк, С.Б. Оразова

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: Saule.Jokebayeva@kaznu.kz

Рост и накопление экономически важных метаболитов некоторыми видами диатомовых микроводорослей в культуре

Определены ростовые кривые диатомовых водорослей *Achanthes hauckiana* (штамм D6), *Navicula gastrum* (D1r), *Nitzshia fonticola* (D1a), выделенных из пресноводных источников Алматинской области, на двух питательных средах (среды SAG и Cohn). Установлено, что по содержанию каротиноидов изученные культуры диатомей не отличаются друг от друга, тогда как содержание фотосинтетических пигментов (хлорофиллы А и С) является видоспецифичным. Максимальным содержанием липидов характеризуется культура *Nitzshia fonticola* (до 32% от сухой массы), минимальным (до 18% от сухой массы) – культура *Achanthes hauckiana*.

Ключевые слова: диатомеи, рост, пигменты, липиды.

S.A. Dzhokebaeva, T.A. Karpenyuk, S.B. Orazova

The growth and accumulation of economically important metabolites in some species of diatom algae in culture

Defined growth curves of diatoms *Achanthes hauckiana* (D6), *Navicula gastrum* (D1r), *Nitzshia fonticola* (D1a), allocated from freshwater sources Almaty region, on two nutrient media (SAG and Cohn). It is established that the content of carotenoids of diatoms culture not differ from one another, whereas the contents of photosynthetic pigments (chlorophyll A and C) is species-specific. Maximum content of lipid characterized by a culture *Nitzshia fonticola* (up to 32% of dry weight), minimal (up to 18% of dry weight) – culture *Achanthes hauckiana*.

Key words: diatoms, growth, pigments, lipids.

С.Ә. Жөкебаева, Т.А. Карпенюк, С.Б. Оразова

Культурада кейбір диатомды микробалдырлар түрлерінің өсуі мен экономикалық маңызды метаболиттерді жинақтауы

Алматы облысының тұщы су көздерінен бөлініп алынған *Achanthes hauckiana* (D₆ штамы), *Navicula gastrum* (D_{1r}), *Nitzshia fonticola* (D_{1a}) диатомды балдырларының екі түрлі қоректік ортадағы (SAG және Cohn қоректік орталары) өсу қисығы анықталды. Каротиноидтар мөлшері бойынша зерттелген диатомея культураларында өзара айырмашылықтары болмайтындығы, ал фотосинтетикалық пигменттер (А және С хлорофилдері) бойынша түр ерекшелігі бар екендігі белгілі болды. Липидтердің ең жоғары мөлшері бойынша *Nitzshia fonticola* культурасы (құрғақ массасының 32%-ға дейін), ал ең төменгі мөлшері бойынша *Achanthes hauckiana* культурасы (құрғақ массасының 18%-ға жуығы) сипатталды.

Түйін сөздер: диатомея, өсу, пигменттер, липидтер.

Диатомовые водоросли (*Bacillariophyta* или *Diatomeae*) представляют собой своеобразную группу одноклеточных микроскопических ор-

ганизмов, резко отличающуюся от остальных водорослей. Являясь фотосинтетиками, они обладают экзоскелетом, называемым панцирем,

и представляют собой основное звено в циклах углерода и кремния в водной среде [1-3]. Диатомеи являются убиквистами, то есть, могут заселять различные среды и вступать в разнообразные взаимоотношения с различными организмами. Они могут жить в пресной и соленой воде, тропических и полярных широтах, во льду и высокогорных озерах. Видовое разнообразие диатомовых водорослей трудно точно оценить количественно. По последним данным, в мире насчитывается около 200 000 видов, объединяемых в более чем сотню родов [4]. Ежегодно диатомеи фиксируют четверть имеющегося в океанах неорганического углерода, что составляет 20% фиксированного фотосинтетическим путем углерода на планете [5]. Этому способствует также и то, что, кроме обычного для всех водорослей С3-пути усвоения углерода, у них имеется возможность перейти на альтернативный путь фиксации углерода по типу С4-пути фотосинтеза [6]. Занимая определенное место в трофических цепочках, они являются важным компонентом фитопланктона и незаменимыми продуцентами органического вещества в водных средах [7-9]. Некоторые диатомовые водоросли способны к миксотрофии, то есть обладают определенной способностью к гетеротрофному усвоению органических форм как углерода, так и азота [10]. Основным пигментом фотосинтеза у диатомей, как и других водорослей, является хлорофилл А, а также имеется особая его форма – хлорофилл С. Фитопланктонные диатомовые водоросли, обитающие в воде, проявляют большую пластичность в использовании солнечной энергии при одинаковой радиации. Известно, что некоторые диатомеи способны к накоплению в соответствующих условиях липидов свыше 60% и синтезу полиненасыщенных жирных кислот типа ω -3, а также изопреноидных дериватов, в числе которых каротиноиды: диатоксантин, диадиноксантин и фукоксантин [11-14].

Целью данной работы являлось изучение интенсивности роста диатомовых водорослей при культивировании на различных средах и определение накопления ими некоторых пигментов и липидов.

Материалы и методы

Для определения интенсивности ростовых процессов среди имеющихся в коллекции штаммов *Bacillariophyta* отобраны три вида:

Achanthes hauckiana (штамм D6) *Navicula gastrum* (D1г), *Nitzshia fonticola* (D1а), выделенных нами из пресноводных источников Алматинской области. Культуры выращивали в конических колбах Эрленмейера, содержащих по 80 мл сред SAG [15] или Cohn [16]. Перед инокуляцией посевного материала в колбы проводилось выравнивание плотности клеток во всех вариантах опыта. Продолжительность культивирования – 7 суток, при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$ и фотопериоде 16 ч свет/8 ч темнота. Концентрацию клеток в суспензиях диатомовых водорослей определяли методом прямого счета в камере Горяева и косвенно – по определению поглощения клеточных суспензий при 420 нм с последующим пересчетом по калибровочному графику. Содержание пигментов определяли в ацетоновых вытяжках спектрофотометрически и рассчитывали по формулам [17]. Экстракцию липидов из клеток микроводорослей осуществляли по модифицированному методу М. Кейтс [18]. Повторность в опытах трехкратная.

Результаты и их обсуждение

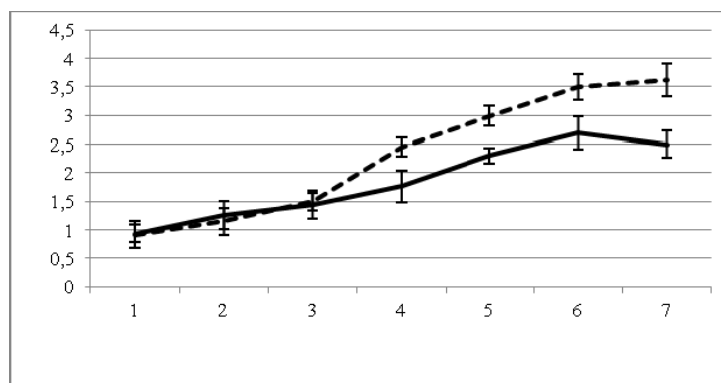
Для культивирования диатомовых водорослей предлагаются различные питательные среды. Большинство из них предназначены для морских видов. В предварительных опытах испытано 6 видов минеральных сред: fwDM (fresh water diatom media), DAM (diatom artificial media), SAG, Cohn, Чу-10 (Chu 10), Фитцджеральда, на которых проводилось культивирование диатомей, предварительно выровненных по плотности. По результатам, полученным через 10 дней культивирования, наиболее благоприятными для роста большинства видов оказались среды SAG и Cohn, где численность клеток была выше, чем в остальных вариантах. Указанные среды содержат идентичный набор минеральных солей. Имеются количественные отличия в содержании минералов: нитрата и фосфата несколько больше в среде Cohn. В эту среду добавляется также небольшое количество почвенной вытяжки, как источника гуматов и других органических компонентов. Следует также отметить, что содержание таких витаминов, как биотин, B_{12} , в среде Cohn значительно выше, чем в среде SAG.

Для проведения физиолого-биохимических исследований по накоплению в клетках каких-либо метаболитов чаще всего используют культуры, находящиеся в конце экспоненциальной

фазы роста. В более ранних и более поздних фазах роста образующиеся метаболиты, как правило, или быстро расходуются на обеспечение ростовых процессов пластическим материалом, или накопленные метаболиты могут быть утрачены при лизисе, наступающем при прекращении роста и деления клеток. Для выяснения срока культивирования, при котором экспоненциальная фаза роста завершается, необходимо было

определить динамику роста культур на этих средах.

Как показывает рисунок 1, на котором представлены ростовые кривые культуры *Navicula gastrum* на двух видах сред, начиная с третьих суток культивирования численность диатомей, растущих на среде Cohn, начинает резко увеличиваться по сравнению с культурой, растущей на среде SAG.



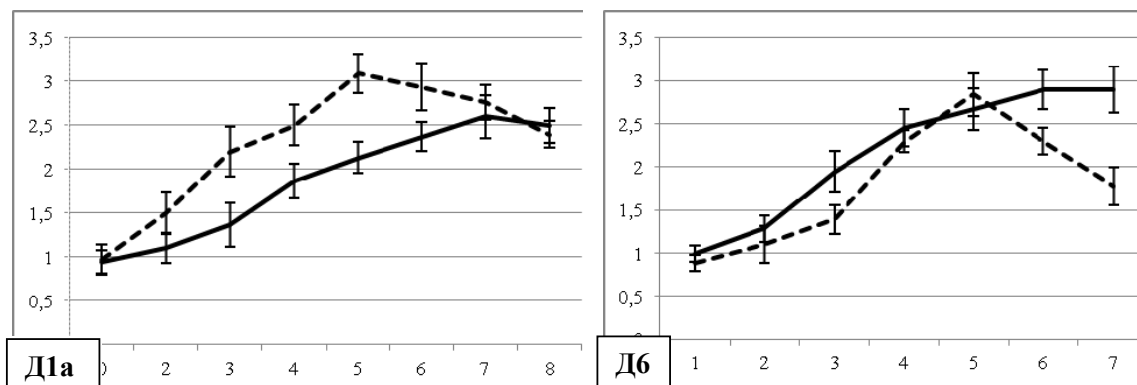
по оси ординат – концентрация клеток, 10⁶/мл; оси абсцисс – продолжительность культивирования, сутки.

Рисунок 1 – Динамика изменения концентрации клеток *Navicula gastrum* (Д1г) при росте на средах SAG (—) и Cohn (---)

К седьмым суткам скорость роста на среде Cohn начинает замедляться: прирост достигает лишь 0,15 млн клеток/мл, хотя ростовая кривая продолжает идти вверх, в то время как на среде SAG наблюдается снижение кривой роста.

На рисунке 2 представлены ростовые кривые двух других культур диатомовых водорос-

лей. Они свидетельствуют о том, что при выращивании на среде SAG обе культуры переходят в стационарную фазу к 7-м суткам культивирования, тогда как при росте на среде Cohn точка перегиба ростовых кривых культур наблюдается в более ранние сроки (начиная с пятых суток культивирования количество клеток в среде быстро снижается).



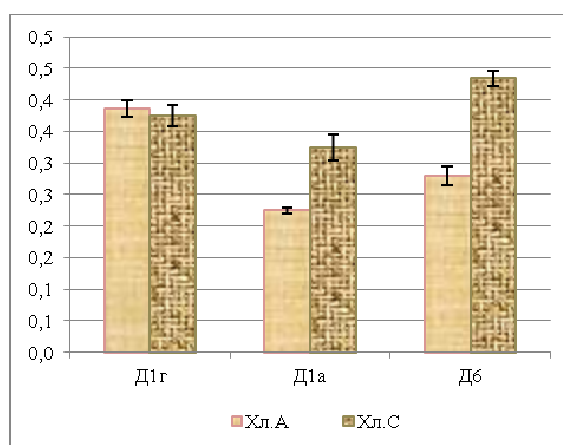
по оси ординат – концентрация клеток, 10⁶/мл; оси абсцисс – продолжительность культивирования, сутки.

Д1а – *Nitzshia fonticola*, Д6 – *Achanthes hauckiana*

Рисунок 2 – Динамика изменения концентрации клеток диатомовых водорослей при росте на средах SAG (—) и Cohn (---)

Количественное определение пигментов и липидов было проведено в клетках диатомей, росших 7 дней на среде SAG, поскольку при использовании этой среды ростовые процессы культур характеризовались синхронностью и близкими показателями плотности клеток в пересчете на мл среды. Установлено, что содержание фотосинтетических пигментов в клетках изучаемых диатомей видоспецифично (рисунки 3 и 4). Наибольшее содержание хлорофилла А характерно для клеток культуры *Navicula gastrum* (Д1г). Хлорофилла С у этой диатомеи примерно такое же количество, как и хлорофилла А. У культуры *Nitzshia fonticola* (D1a) и культуры

Achanthes hauckiana (D6) на седьмые сутки культивирования (стационарная фаза роста) преобладающим фотосинтетическим пигментом оказался хлорофилл С, содержание которого было в 1,5 раза больше, чем хлорофилла А. Поскольку отношение хлорофилл С / хлорофилл А является показателем физиологического состояния водорослей, увеличиваясь в “стареем” материале, можно заключить, что прекращение роста и деления клеток в культуре этих водорослей идет быстрее, а деструктивные процессы более ярко выражены, поскольку увеличение отношения связано с тем, что хлорофилл А разлагается быстрее, чем хлорофилл С.

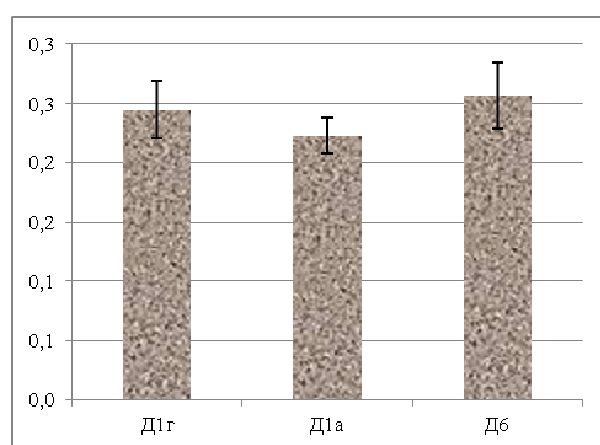


по оси ординат – содержание хлорофиллов,
% к сухой массе

Рисунок 3 – Содержание хлорофиллов А и С в клетках диатомовых водорослей

Вариации в содержании каротиноидов у изучаемых видов диатомовых водорослей незначительны: от 0,22 до 0,26% к сухой массе. Однако, соотношения каротиноидов и хлорофилла А, свидетельствующие о наличии фотосинтетически активных клеток, достаточно высоки, что отражает переход клеток в неактивное состояние.

Содержание липидов изменяется от 18,1 до 32,2% в расчете на сухую массу культуры (ри-

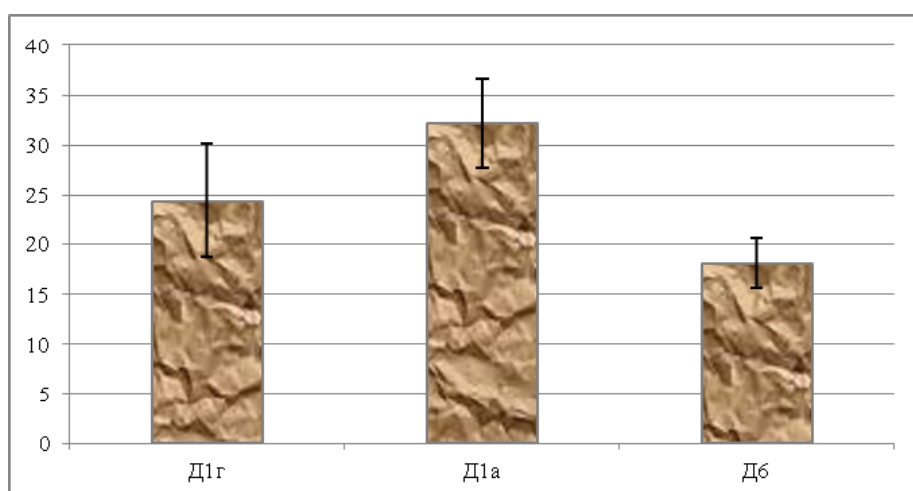


по оси ординат – содержание каротиноидов,
% к сухой массе

Рисунок 4 – Содержание каротиноидов в клетках диатомовых водорослей

сунк 5). Максимальным содержанием липидов характеризуется культура *Nitzshia fonticola*, минимальным – культура *Achanthes hauckiana*.

Таким образом, в качестве источника липидов, накопленных к началу стационарной фазы роста, наибольший интерес представляет культура *Nitzshia fonticola*, в качестве источника каротиноидов и фотосинтетических пигментов одинаково перспективны все три изученные культуры.



по оси ординат – содержание липидов, % к сухой массе

Рисунок 5 – Содержание липидов в клетках диатомовых водорослей

Литература

- 1 Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'indice biologique diatomées. Paris, 2000. -135 p.
- 2 Gastineau R. Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type Marennine // Thèse de doctorat de l'Université du Maine, Le Mans, France, 2012. – 328 p.
- 3 Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. Водоросли. Справочник. – Киев: Наук.думка, 1989. – 608 с.
- 4 Bentley K., Cox E.J., Bentley P.J. Nature's batik: a computer evolution model of diatom valve morphogenesis // Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2005. – Vol. 5. – P. 25-34.
- 5 Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. Algal biodiversity // Phycologia. – 1996. – Vol. 35. – P. 353-356.
- 6 Reinfelder J.R., Milligan A.J., Morel F.M.M. The rate of the C4 pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135, N. 4. – P. 2106 – 2111.
- 7 Dugdale R. C., Wilkerson F. Nutrient limitation of new production in the sea. In: P. G. Falkowski and A. D. Woodhead [eds.] Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. – Plenum Press, 1992. – P. 107–122.
- 8 Sarthou G., Timmermans K. R., Blain S., Treguer P. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: A review // J. Sea Res. – 2005. -Vol. 53. – P. 25–42.
- 9 Wetz M. S., Wheeler P.A. Release of dissolved organic matter by coastal diatoms // Limnol. Oceanogr. – 2007. – Vol. 52, N. 2. – P. 798–807.
- 10 Liu X., Duan S., Aifen L. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum* // J. Appl. Phycol. – 2009. – Vol. 21. – P. 239–246.
- 11 Sanjay K. R., Nagendra P. M. N., Anupama S. Isolation of diatom *Navicula cryptocephala* and characterization of oil extracted for biodiesel production // African Journal of Environmental Science and Technology. – 2012. – Vol. 7, N. 1. – P. 41-48.
- 12 Fajardo A. R., Cerdón L.E., Medina A.R. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2007. – Vol. 109. – P. 120–126.
- 13 Supriya G., Ramachandra T.V. Chronicle of Marine Diatom Culturing Techniques // Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. – 2011. – Vol. 1, N. 3. – P. 282-294.
- 14 Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae. Review // Journal of bioscience and bioengineering. – 2006. – Vol. 101, N. 2. – P. 87-96.
- 15 Guillard R.R.L., Lorenzen C.J. Yellow green algae with chlorophyllide c // J. Phycol. – 1972. Vol. 11. – P. 10-14.
- 16 Cohn S.A., Pickett-Heaps J.D. The effects of colchicine and dinitrophenol on the in vivo rates of anaphase A and B in the diatom *Surirella* // Eur.J.Cell.Biol. – 1988. – Vol. 35. – P. 523-530.
- 17 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. Pflanz. – 1975. – Vol. 167. – P. 191-194.
- 18 Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 234 с.

References

- 1 Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'indice biologique diatomées. Paris, 2000. -135 p.
- 2 Gastineau R. Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type Marenne // Thèse de doctorat de l'Université du Maine, Le Mans, France, 2012. – 328 p.
- 3 Vasser S.P., Kondrat'eva N.V., Masjuk N.P. Vodorosli. Spravochnik – Kiev: Nauk.dumka, 1989. – 608 p.
- 4 Bentley K., Cox E.J., Bentley P.J. Nature's batik: a computer evolution model of diatom valve morphogenesis // Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2005. – Vol. 5. – P. 25-34.
- 5 Norton T.A., Melkonian M., Andersen R.A. Algal biodiversity // Phycologia. – 1996. – Vol. 35. – P. 353-356.
- 6 Reinfelder J.R., Milligan A.J., Morel F.M.M. The rate of the C4 pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 135, N. 4. – P. 2106 – 2111.
- 7 Dugdale R. C., Wilkerson F. Nutrient limitation of new production in the sea. In: P. G. Falkowski and A. D. Woodhead [eds.] Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. – Plenum Press, 1992. – P. 107–122.
- 8 Sarthou G., Timmermans K. R., Blain S., Treguer P. Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: A review // J. Sea Res. – 2005. -Vol. 53. – P. 25–42.
- 9 Wetz M. S., Wheeler P.A. Release of dissolved organic matter by coastal diatoms // Limnol. Oceanogr. – 2007. – Vol. 52, N. 2. – P. 798–807.
- 10 Liu X., Duan S., Aifen L. Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricornutum* // J. Appl. Phycol. – 2009. – Vol. 21. – P. 239–246.
- 11 Sanjay K. R., Nagendra P. M. N., Anupama S. Isolation of diatom *Navicula cryptocephala* and characterization of oil extracted for biodiesel production // African Journal of Environmental Science and Technology. – 2012. – Vol. 7, N. 1. – P. 41-48.
- 12 Fajardo A. R., Cerdón L.E., Medina A.R. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum* // Eur. J. Lipid Sci. Technol. – 2007. – Vol. 109. – P. 120–126.
- 19 Supriya G., Ramachandra T.V. Chronicle of Marine Diatom Culturing Techniques // Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences. – 2011. – Vol. 1, N. 3. – P. 282-294.
- 20 Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae. Review // Journal of bioscience and bioengineering. – 2006. – Vol. 101, N. 2. – P. 87-96.
- 21 Guillard R.R.L., Lorenzen C.J. Yellow green algae with chlorophyllide c // J. Phycol. – 1972. Vol. 11. – P. 10-14.
- 22 Cohn S.A., Pickett-Heaps J.D. The effects of colchicine and dinitrophenol on the in vivo rates of anaphase A and B in the diatom *Surirella* // Eur.J.Cell.Biol. – 1988. – Vol. 35. – P. 523-530.
- 23 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. Pflanz. – 1975. – Vol. 167. – P. 191-194.
- 24 Kejts M. Tehnika lipidologii. – M.: Mir, 1975. – 234 p.