

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ХЛОРЕЛЛЫ
ПРИ ДЕПРИВАЦИИ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ
ИСТОЧНИКА АЗОТА – KNO₃**

И.А. Ильючик, Л.О. Захаревич, В.Н. Никандров

Полесский государственный университет,
irina.iliuchik@mail.ru, nikandrov.vitaly@gmail.com

Аннотация. Исключение из состава питательной среды источника азота угнетает развитие культуры хлореллы и снижает концентрацию белка в клетках. Однако на протяжении 21 суток культура водоросли не погибала. По-видимому, в клетках инокулята имеются достаточные резервы для резистентности в столь экстремальных условиях. Нарастание уровня хлорофиллов в начальный период культивирования, а также увеличение концентрации каротиноидов на всем протяжении процесса при депривации в питательной среде источника азота в сравнении с контрольным вариантом, возможно, является отражением компенсаторно-приспособительных механизмов клетки. Для более определенного суждения необходимо получение материалов о редокс-статусе клетки хлореллы в отсутствие источника азота в питательной среде.

Ключевые слова: хлорелла, питательная среда, источник азота, биомасса, белок, хлорофиллы, каротиноиды.

Хлорелла (*Chlorella*) – род одноклеточных неподвижных зеленых водорослей, относящихся к типу зеленых водорослей (*Chlorophyta*). *Chlorella vulgaris* широко распространена в природе, нетребовательна к условиям обитания и размножается с высокой скоростью. Это дает возможность получать значительное количество биомассы в короткий срок. В настоящее время хлореллу благодаря высокой пластичности метаболизма и биологической ценности: высокого содержания белка (51–58% сухого веса), незаменимых аминокислот, β-1,3-глюкана, витаминов (комплекс В и С), минеральных веществ, β-каротина и фактора роста хлореллы (CGF) широко используют для различных целей биотехнологии, включая производство корма для животных, жирных кислот, альгинатов, очистку сточных вод, биотопливо и др. [1].

Для роста хлореллы необходимы углерод, азот, фосфор, сера и металлы. Концентрация азота в питательной среде играет важную роль в регуляции роста и метаболизма водорослей. В отличие от высших растений, в вегетативных органах которых содержание азота не превышает обычно 1,5–5% (на сухую массу), в клетках хлореллы оно достигает 7–10%. Для биосинтеза одного килограмма сухого вещества ею поглощается 75–95 г азота. [2]. При дефиците азота в среде в клетках, главным образом, накапливаются липиды и углеводы, в то время как при росте на среде богатой азотом – преимущественно белок [3].

Цель работы: выявить изменения физиолого-биохимического состояния клеток *Chlorella vulgaris* при депривации в питательной среде источника азота.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на культуре *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 из коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Хлореллу культивировали на питательной среде Тамийя, содержащей KNO_3 в концентрации 5,0 г/л (контрольный вариант). В экспериментальном варианте питательной среды KNO_3 отсутствовал.

Ch. vulgaris культивировали в прозрачных стеклянных емкостях объемом 0,25 л при температуре 25 ± 1 °С при периодическом перемешивании, освещенности на поверхности сосуда – 5000 лК и продолжительности световых и темновых фаз – 12/12 часов в течение 21 суток. Посевная доза культуры составляла $3,46 \pm 0,06$ млн/мл клеток, предварительно отмытых дистиллированной водой от предыдущей питательной среды.

Каждые вторые сутки культивирования учитывали количество клеток водоросли с помощью камеры Горяева и отбирали аликвоты культуры по $10 \pm 0,19$ млн клеток. Клетки отделяли центрифугированием и гомогенизировали в дистиллированной воде. В гомогенате определяли концентрацию внутриклеточного белка и фотосинтетических пигментов (хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов) как подробно описано ранее [4]. Концентрацию хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов рассчитывали по формулам Н.К. Lichtenthaler после экстракции пигментов 100%-ным ацетоном [5].

Исследования проведены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы *Statistica 6.0*. Достоверность различий между вариантами определяли по *t*-коэффициенту Стьюдента для уровня значимости $P \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Исключение из состава питательной среды источника азота сопровождалось угнетением роста культуры хлореллы уже через 24 часа на 9,7% (таблица 1, рисунок). В этом случае максимальный уровень биомассы отмечен через 11 дней – в 1,4 раза в сравнении с началом культивирования. В то же время в контрольном варианте максимум урожая биомассы наблюдали через 21 день, и увеличение его составило 2,6 раза в сравнении с началом роста. А в сравнении с экспериментальным вариантом питательной среды это увеличение происходило в 3,1 раза. Однако культура при исключении источника азота из питательной среды на протяжении всего эксперимента не погибала, была жизнеспособной.

Уровень внутриклеточного белка в культуре хлореллы при депривации источника азота в питательной среде падал на протяжении всего периода культивирования, особенно сильно – начиная с 13 дня и далее, на 60–69% (таблица 1, рисунок). Это вполне объяснимо, поскольку нарушался нормальный процесс аминирования органических кислот – синтез аминокислот.

При исключении из состава питательной среды источника азота концентрация хлорофиллов *a* и *b* в начальный период культивирования – 3 дня в сравнении с контрольным вариантом возрасала на 21–67% (таблица 2, рисунок).

Таблица 1. – Динамика биомассы и уровня внутриклеточного белка *Chlorella vulgaris* при росте культуры на среде, не содержащей KNO_3 ($n = 9$)

Время роста, сутки	Биомасса, млн клеток/мл		Белок, мкг/мл млн клеток	
	Контроль, KNO_3 5,0 г/л	без KNO_3	Контроль, KNO_3 5,0 г/л	без KNO_3
1	$4,02 \pm 0,07$	$3,63 \pm 0,03$	$14,04 \pm 0,06$	$11,97 \pm 0,07^*$
3	$3,51 \pm 0,07$	$2,84 \pm 0,06^*$	$12,21 \pm 0,04$	$11,08 \pm 0,05$
5	$4,30 \pm 0,11$	$3,78 \pm 0,10^*$	$20,76 \pm 0,09$	$15,34 \pm 0,08^*$
7	$5,05 \pm 0,05$	$4,03 \pm 0,12^*$	$31,08 \pm 0,03$	$21,28 \pm 0,10^*$
9	$6,51 \pm 0,04$	$4,53 \pm 0,07^*$	$44,25 \pm 0,05$	$24,06 \pm 0,03^*$
11	$7,82 \pm 0,06$	$5,02 \pm 0,08^*$	$50,90 \pm 0,07$	$26,44 \pm 0,04^*$
13	$8,19 \pm 0,03$	$4,15 \pm 0,06^*$	$56,78 \pm 0,03$	$22,69 \pm 0,02^*$
15	$7,90 \pm 0,08$	$4,05 \pm 0,10^*$	$54,11 \pm 0,05$	$20,74 \pm 0,04^*$
17	$8,56 \pm 0,04$	$3,56 \pm 0,07^*$	$60,23 \pm 0,13$	$20,06 \pm 0,07^*$
19	$9,72 \pm 0,03$	$3,89 \pm 0,13^*$	$59,80 \pm 0,05$	$23,13 \pm 0,09^*$
21	$10,45 \pm 0,10$	$3,40 \pm 0,03^*$	$64,91 \pm 0,11$	$19,82 \pm 0,03^*$

Примечание: * – здесь и далее статистически достоверные изменения, $P \leq 0,05$

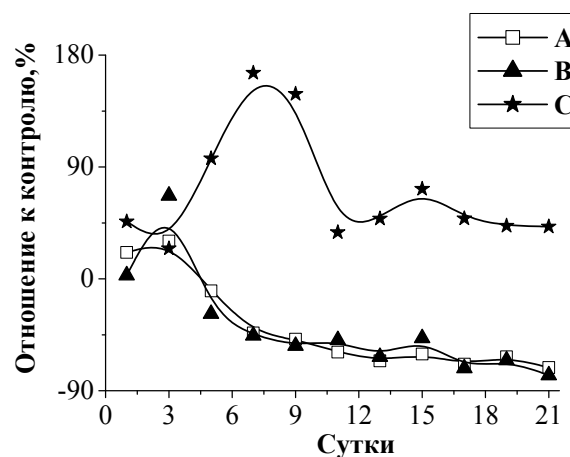
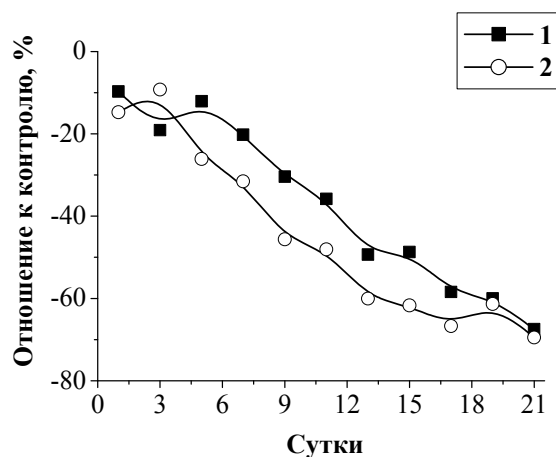


Рисунок – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы (1), внутриклеточного белка (2), хлорофиллов *a* (A), *b* (B) и каротиноидов (C) в клетках культуры *Chlorella vulgaris* при росте культуры на питательной среде, не содержащей KNO₃

Это может быть отражением компенсаторных сдвигов: «попытки» культуры адаптироваться к измененным условиям роста. На протяжении всего последующего периода содержание хлорофиллов в клетках водоросли увеличивалось в сравнении с началом роста на 65–88%. Однако, по сравнению с контрольным вариантом величина этого показателя уменьшилась на 28–78%.

Уровень каротиноидов при этом на экспериментальном варианте питательной среды заметно превосходил таковой на контрольном варианте среды.

Таблица 2. – Содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов (мкг/мл млн клеток) в клетках *Chlorella vulgaris* при росте культуры на среде, не содержащей KNO₃ (*n* = 9)

Время роста, сутки	Хлорофилл <i>a</i>		Хлорофилл <i>b</i>		Каротиноиды	
	Контроль, KNO ₃ 5,0 г/л	без KNO ₃	Контроль, KNO ₃ 5,0 г/л	без KNO ₃	Контроль, KNO ₃ 5,0 г/л	без KNO ₃
1	5,03 ± 0,07	6,10 ± 0,03*	3,11 ± 0,03	3,20 ± 0,08	0,91 ± 0,09	1,33 ± 0,08*
3	4,48 ± 0,03	5,84 ± 0,09*	2,24 ± 0,06	3,74 ± 0,12*	0,94 ± 0,07	1,17 ± 0,04*
5	9,10 ± 0,06	8,22 ± 0,06	6,80 ± 0,07	4,89 ± 0,03*	1,30 ± 0,03	2,56 ± 0,06*
7	16,46 ± 0,04	9,30 ± 0,07*	9,47 ± 0,03	5,15 ± 0,05*	1,43 ± 0,12	3,80 ± 0,03*
9	16,06 ± 0,09	8,27 ± 0,03*	9,13 ± 0,08	4,21 ± 0,07*	1,25 ± 0,05	3,11 ± 0,07*
11	24,48 ± 0,10	10,06 ± 0,11*	11,59 ± 0,04	5,89 ± 0,04*	2,16 ± 0,08	2,97 ± 0,10*
13	26,82 ± 0,05	9,14 ± 0,05*	11,09 ± 0,09	4,13 ± 0,09*	2,07 ± 0,04	3,03 ± 0,05*
15	25,09 ± 0,03	9,92 ± 0,10*	10,28 ± 0,07	5,38 ± 0,12*	2,03 ± 0,13	3,50 ± 0,09*
17	29,53 ± 0,09	9,25 ± 0,08*	18,01 ± 0,10	5,06 ± 0,06*	2,14 ± 0,09	3,18 ± 0,04*
19	28,44 ± 0,05	10,60 ± 0,04	17,44 ± 0,08	6,02 ± 0,07	2,27 ± 0,04	3,24 ± 0,13
21	30,18 ± 0,06	8,64 ± 0,08	18,50 ± 0,05	4,15 ± 0,09	2,33 ± 0,10	3,31 ± 0,08

Уже через 24 часа культивирования на среде, не содержащей нитрата калия, их уровень превосходил таковой в сравнении с контрольным вариантом на 46% (таблица 2, рисунок). А в конечный период культивирования, начиная с 15 дня, на экспериментальном варианте питательной среды концентрация каротиноидов в клетках хлореллы возросла в 2,4–2,6 раза, что сопоставимо с динамикой сдвигов этого показателя на контрольном варианте среды. Однако в сравнении с контрольным вариантом при исключении из состава среды нитрата калия общее содержание каротиноидов в клетках хлореллы увеличивалось на 38–166% в зависимости от срока культивирования. Возможно, это также носит компенсаторный характер, учитывая способность, например, β -каротинов, специфически и эффективно улавливать синглетный кислород.

Ранее нами было показано, что исключение из состава питательной среды источника азота – KNO_3 при непрерывном (в отличие от настоящего эксперимента) барботировании при падении уровня внутриклеточного белка не вело к угнетению роста культуры в сравнении с контрольным вариантом на протяжении 21 дня, снижению уровня хлорофилла *a* и сильному увеличению концентрации каротиноидов [6].

К сожалению, в литературе нет каких-либо материалов о состоянии редокс-статуса клетки хлореллы при культивировании на среде, лишенной источника азота.

Заключение. Итак, исключение из состава питательной среды источника азота угнетает развитие культуры хлореллы и снижает концентрацию белка в клетках, что вполне объяснимо, учитывая значение реакций аминирования для этого. Тем не менее, на протяжении 21 суток культура водоросли не погибала. Это позволяет считать, что в клетках инокулята имеются достаточные резервы для резистентности в столь экстремальных условиях. Нарастание уровня хлорофиллов в начальный период культивирования, а также увеличение концентрации каротиноидов на всем протяжении процесса при депривации в питательной среде источника азота в сравнении с контрольным вариантом, возможно, является отражением компенсаторно-приспособительных механизмов клетки. Однако для более определенного суждения требуется получение материалов о редокс-статусе клетки хлореллы в отсутствие источника азота в питательной среде.

Список использованных источников

1. Bleakley, S. Algal proteins: extraction, application, and challenges concerning production / S. Bleakley, M. Hayes // Foods. – 2017. – Vol. 6, iss. 5. – P. 33.
2. Shi, X. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources / X. Shi, X. Zhang, F. Chen // Enzyme Microb Technol. – 2000. – Vol. 27, iss. 3–5. – P. 312–318.
3. Goncalves, E. Conversion of membrane lipid acyl groups to triacylglycerol and formation of lipid bodies upon nitrogen starvation in biofuel green algae *Chlorella* UTEX29 / E. Goncalves, J. Johnson, B. Rathinasabapathi // Planta. – 2013. – Vol. 238, iss. 5. – P. 895–906.
4. Ильючик, И. А. Методические рекомендации по изучению биохимических свойств одноклеточных зеленых водорослей (на примере *Chlorella vulgaris*) / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров. – Пинск : ПолесГУ, 2020. – 29 с.
5. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова ; под ред. И. П. Ермакова. – М. : Изд. центр «Академия», 2003. – 256 с.
6. Ильючик, И. А. Физиолого-биохимическое состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris* штамма ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с карбонатом аммония / И. А. Ильючик, Е. М. Кандыба, В. Н. Никандров // Весн. Палес. дзярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. – 2019. – № 2. – С. 40–50.