

Моделирование содержания хлорофилла *a* в культурах микроводорослей

Лелеков А.С.* , Тренкеншу Р.П.**

Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

Аннотация. Работа посвящена исследованию механизмов влияния света на содержание хлорофилла *a* в биомассе микроводорослей методом математического моделирования. Показано, что существующие математические модели базируются на представлениях о синтезе и фотодеструктивном окислении хлорофилла *a*. Однако для некоторых видов микроводорослей фотодеструкция данного пигмента поставлена под сомнение. Предложен альтернативный подход к моделированию светозависимого содержания хлорофилла *a* в биомассе микроводорослей. В основе базовой модели лежит представление о двухстадийности фотоавтотрофного роста микроводорослей. На первой стадии в процессе фотосинтеза образуется резервная часть биомассы, из которой на второй стадии происходит биосинтез клеточных структур. Предполагается, что хлорофилл *a* относится к структурным формам биомассы. Для различных условий лимитирования рассмотрено три частных решения базовой системы, описывающих зависимость содержания хлорофилла *a* от внешней интенсивности света. Равенство удельных скоростей образования резервных и структурных форм биомассы накладывает условие применимости полученных уравнений только в стационарном динамическом равновесии плотностатной культуры. Верификация полученных уравнений для *Arthrospira platensis* позволила оценить величины кинетических коэффициентов, значения которых, в целом, соответствуют теоретически рассчитанным диапазонам. Для приближённых вычислений предложено простое уравнение, которое показало высокое соответствие с экспериментальными данными для *Tetraselmis viridis* ($R^2 = 0.98$), *Dunaliella tertiolecta* ($R^2 = 0.92$) и хорошо описывает результаты для *Skeletonema costatum* и *Chlorella vulgaris* ($R^2 = 0.8$). Доля хлорофилла *a* в структурной биомассе составляет около 2.5–3.5 % и является видоспецифичным параметром.

Ключевые слова: культура микроводорослей, плотностат, хлорофилл *a*, световые условия, фотобиосинтез.

ВВЕДЕНИЕ

Содержание хлорофилла *a* в биомассе микроводорослей является ключевым параметром, лежащим в основе расчёта первичной продукции в Мировом океане [1–3]. Для различных систематических групп микроводорослей отмечено уменьшение количества хлорофилла *a* и других пигментов с ростом облучённости [4]. Также изменяются соотношения между различными фотосинтетическими пигментами [5]. Весьма показательной в этой области исследований является работа [6]. Авторы проанализировали большой экспериментальный материал для 17 видов фитопланктона и показали, что форма зависимости содержания хлорофилла от света одинакова практически для всех классов и видов морских микроводорослей.

* a.lelekov@yandex.ru

** trenkens@yandex.ru

У эукариотических видов микроводорослей хлорофилл *a* образует с белками комплекс, который представляет собой структурный компонент хлоропластов. Прокариотические микроводоросли также содержат хлорофилл *a* в виде комплекса с белками, которые сосредоточены в специализированных структурных компартментах [7, 8]. В обоих случаях можно констатировать, что хлорофилл *a* является структурным компонентом микроводорослевой биомассы. Это означает, что в условиях нормального роста популяции клеток соотношение хлорофилл *a* / белок должно оставаться постоянным. С одной стороны, такое утверждение можно считать спорным, т. к. существует множество работ, в которых авторы такого постоянства не обнаруживают. С другой стороны, можно выделить публикации, где такое постоянство наблюдается в широком диапазоне концентраций хлорофилла *a* и белка [9, 10]. Например, на рисунке 1 представлена линейная зависимость концентрации хлорофилла *a* от общего белка для цианопрокариоты *Arthrospira platensis* по данным [9]. Независимо от постоянства рассмотренного соотношения, можно утверждать, что эти вопросы связаны с трансформациями биохимического состава микроводорослей.

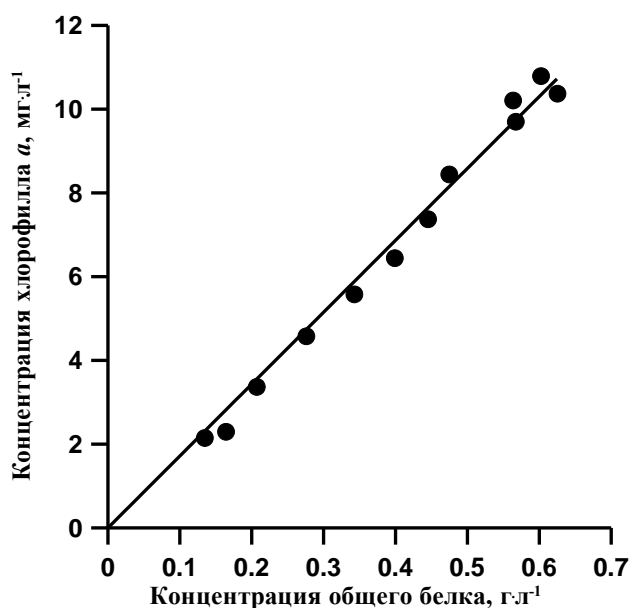


Рис. 1. Линейная зависимость между концентрацией общего белка и хлорофилла *a* для цианопрокариоты *Arthrospira (Spirulina) platensis* [9].

Существует две группы моделей, которые описывают влияние интенсивности света на величину относительного содержания пигментов в биомассе микроводорослей β . Во-первых, это группа эмпирических моделей, которые получены при статистическом анализе реальных экспериментальных данных количественного содержания пигментов в клетках различных видов микроводорослей [2, 11, 12]. В дальнейшем Гейдер с соавторами [13] предложил модель, которая основывается на том, что наблюдаемая скорость роста есть разница между скоростью фотосинтеза и дыхания, а наблюдаемая скорость изменения концентрации хлорофилла *a* является разностью скоростей его синтеза и деструкции. В основе второй группы моделей положен стохастический подход взаимодействия светового потока и пигментной системы [14, 15]. Здесь учитывается, что под действием света наряду с синтезом пигментов происходит их обратимое фотодеструктивное окисление, а также частичная репарация. При малых интенсивностях света величина β стремится к максимальному значению β_{\max} , при больших интенсивностях β стремится к минимальному значению β_{\min} . Данные коэффициенты являются важнейшими видоспецифичными параметрами и могут быть рассчитаны путём

аппроксимации реальных экспериментальных данных содержания пигментов в биомассе микроводорослей.

Несмотря на широкое распространение гипотезы о фотодеструктивном окислении пигментов, в некоторых работах она подвергается сомнению. Например, для диатомеи *Thalassiosira weissflogii* показано, что скорость распада хлорофилла *a* не зависит от внешней интенсивности света, при этом доля хлорофиллида и других продуктов распада не превышает 2 % клеточного содержания хлорофилла *a* [16]. Такие данные полностью подтверждают предложенный ранее модельный подход, который основан на разделении биомассы на структурную и резервную части [17]. Скорость синтеза хлорофилла определяется не внешней облучённостью, а количеством резервной биомассы и активностью ключевого ферментного комплекса μ_{rs} , который преобразует резервную биомассу в структурную. Конечно, подобные заключения имеют место, если отнести хлорофилл *a* к структурным формам биомассы. В случае, когда клетки полностью обеспечены минеральным питанием и находятся в прочих оптимальных условиях, можно изучить влияние света на соотношение хлорофилл *a* / биомасса. Такие условия можно реализовать только в непрерывной культуре микроводорослей при стабилизации концентрации хлорофилла *a* и варьировании внешнего освещения.

Цель данной работы – на основе известных представлений о процессах фотобиосинтеза микроводорослей предложить комплексную модель, описывающую зависимость содержания хлорофилла *a* от облучённости для непрерывной культуры невысокой плотности.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Общий подход к моделированию фотобиосинтеза и биохимических трансформаций в клетках микроводорослей подробно изложен в работах [17, 18]. Базовым положением является то, что фотоавтотрофный рост микроводорослей можно рассматривать в виде двухстадийного процесса. Первой стадией является собственно фотосинтез, в результате которого за счёт световой энергии происходит ассимиляция минерального углерода и превращение его в полисахариды [19, 20]. Эти углеводы не являются структурными компонентами клеток, а представляют собой энергетический и углеродный резерв для всех последующих метаболических реакций. На второй стадии происходит биосинтез клеточных структур за счёт энергии, выделяющейся при окислении полисахаридов. При этом, процесс окисления сопровождается образованием "скелетного" углерода, из которого формируются все структурные образования в клетках [21].

Описанный выше механизм фотобиосинтеза позволил построить простую математическую модель, описывающую зависимость биохимических трансформаций в клетке от интенсивности света [17]. В этой модели используется положение о том, что биомассу микроводорослей можно рассматривать в виде суммы двух органических форм – структурной и резервной (резервной, запасной или фондовой) [19, 22]. Т. е. биомасса клеток равна сумме структурных и резервных форм:

$$B = B_{str} + B_{res}.$$

Резервная часть биомассы представлена липидами, углеводами, которые могут накапливаться в клетках при тех или иных условиях, например, фосфорилированные моносахара, образованные в цикле Кальвина, аминокислоты, олигопептиды. К структурной части биомассы отнесём белки, липиды, углеводы и др. компоненты, которые непосредственно входят в состав клеточных органелл либо, как ферменты, участвуют в биосинтетических реакциях. Скорость синтеза структуры определяется количеством ресурсной биомассы, а также активностью ключевого фермента. Скорость образования ресурсных составляющих определяется приведённой плотностью потока

внешнего субстрата. Если скорость синтеза некоторых промежуточных соединений (интермедиатов) выше скорости образования структуры, то в клетке будут накапливаться резервные соединения, в противном случае, количество интермедиатов будет уменьшаться. Обозначим через ε величину соотношения структурной и резервной биомассы:

$$\varepsilon = \frac{B_{\text{res}}}{B_{\text{str}}}.$$

В свою очередь соотношение всех структурных составляющих биомассы микроводорослей в фотоавтотрофной культуре является видоспецифическим параметром микроводорослей. В условиях нормального роста и развития культуры данная величина – константа. Это означает, что любой компонент структуры можно выразить через коэффициент, характеризующий его содержание в структурной биомассе.

Содержание хлорофилла в биомассе может быть выражено в различных единицах измерения. Чаще всего его оценивают в весовых долях (или в процентах). Обозначим содержание хлорофилла a (π) в биомассе (B):

$$\beta = \frac{\pi}{B},$$

а долю хлорофилла a в структурной форме биомассы через β_{str} :

$$\beta_{\text{str}} = \frac{\pi}{B_{\text{str}}}.$$

Отсюда:

$$\beta = \frac{\beta_{\text{str}} B_{\text{str}}}{B} = \frac{\beta_{\text{str}} B_{\text{str}}}{B_{\text{str}} + B_{\text{res}}} = \frac{\beta_{\text{str}}}{1 + \varepsilon}.$$

Таким образом, задача сводится к нахождению зависимости ε от интенсивности света. Для непрерывной культуры невысокой плотности, базовая система уравнений, описывающая динамику трансформации структурных и ресурсных форм биомассы микроводорослей при фотоавтотрофном росте, имеет вид [17]:

$$\left\{ \begin{array}{l} \mu = \frac{q_{\text{rs}} \mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{cases} - \mu_{\text{r}} \\ \mu = \frac{\mu_{\text{m}}}{I_{\text{sat}} \varepsilon} \begin{cases} I_0, I_0 < I_{\text{sat}} \\ I_{\text{sat}}, I_0 \geq I_{\text{sat}} \end{cases} - \frac{\mu_{\text{mrs}}}{\varepsilon_{\text{sat}} \varepsilon} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{\text{sat}} \\ \varepsilon_{\text{sat}}, \varepsilon \geq \varepsilon_{\text{sat}} \end{cases} \end{array} \right.,$$

где μ – удельная скорость роста; μ_{m} – максимальная удельная скорость фотосинтеза, I_{sat} – насыщающая внешняя облучённость, ε_{sat} – насыщающее соотношение резервная / структурная биомасса, μ_{mrs} – максимальная удельная скорость преобразования резервной биомассы в структурную, q_{rs} – экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную, μ_{r} – удельная скорость распада структуры.

Анализ базовой системы уравнений показывает, что возможны два варианта лимитирования скорости роста микроводорослей: внешнее (световое), обусловленное недостаточным притоком энергии ФАР, или внутреннее (метаболическое), связанное с преобразованием ресурсных форм биомассы в структурные. Решение базовой системы для того или иного случая позволяет определить искомую зависимость параметра ε от облучённости. Для этого необходимо приравнять первое и второе уравнения системы, исключив величину удельной скорости роста, и записать решение при соответствующих граничных условиях.

Модель 1. Ограничение роста культуры интенсивностью света

Зависимость соотношения ресурсных и структурных макромолекулярных форм в биомассе микроводорослей от интенсивности света представляется в виде [17]:

$$\varepsilon = -\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\mu_m \varepsilon_{\min}}{\mu_r} i_0}, \quad (1)$$

где i_0 – отношение поверхностной облучённости I_0 к насыщающей I_{sat} .

Выражение (1) применимо при условии отсутствия самозатенения клеток микроводорослей, т. е. при невысоких плотностях культуры. При некоторой облучённости I_{cp} – "компенсационный пункт" фотосинтеза, величина ε достигает минимального значения. С ростом интенсивности света ε увеличивается, достигая максимума при I_{sat} . Таким образом, границы применимости выражения (1):

$$\varepsilon_{\min} < \varepsilon < \varepsilon_{sat}, I_{cp} < I_0 < I_{sat}.$$

С учётом (1) содержание хлорофилла a в биомассе микроводорослей имеет вид:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 - \frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\mu_m \varepsilon_{\min}}{\mu_r} i_0}}.$$

Интенсивность света в "компенсационном пункте" фотосинтеза и соответствующее ей минимальное значение ε могут быть выражены через кинетические коэффициенты культуры:

$$i_{cp} = \frac{I_{cp}}{I_{sat}} = \frac{\mu_r}{\mu_m q_{rs}}, \quad \varepsilon_{\min} = \frac{\mu_r}{k_\varepsilon \mu_{mrs} q_{rs}} \varepsilon_{sat},$$

где k_ε – коэффициент, характеризующий смену лимитирующих факторов, численно равный отношению параметра ε при световом и метаболическом лимитировании.

Окончательно, зависимость содержания хлорофилла a от интенсивности света имеет вид:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 - \frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{\min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{\min}}{q_{rs}} \frac{i_0}{i_{cp}}}}. \quad (2)$$

Модель 2. Метаболическое ограничение роста культуры

Рассмотрим второй случай, когда лимитирующим фактором является не внешняя облучённость, а скорость трансформации резервных веществ в структурные формы биомассы. Это означает, что удельная скорость роста микроводорослей достигнет максимума при некоторой ненасыщающей интенсивности света I_{sat} , а соотношение ε в клетках будет изменяться с ростом интенсивности света вплоть до светового насыщения I_{max} . В таких условиях в диапазоне интенсивностей света от I_{cp} до I_{sat} соотношение резервные / структурные формы биомассы описывается уравнением идентичным (1) [23]. При высокой облучённости в диапазоне от I_{sat} до I_{max} удельная скорость роста не изменяется, а величина ε линейно зависит от облучённости:

$$\varepsilon = \varepsilon_{max} i_0. \quad (3)$$

Зависимость относительного содержания хлорофилла a от интенсивности света принимает вид:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 + \varepsilon_{max} i_0}. \quad (4)$$

Модель 3. Превращение части структурной биомассы в резервную

Дополним базовую систему уравнений слагаемым, учитывающим то, что часть структурной биомассы может превращаться в резервную. Этот процесс осуществляется в ходе эндогенного катаболизма ("темнового дыхания") микроводорослей. Расход части структурной биомассы обеспечивает процессы фотобиосинтеза дополнительным количеством энергии в форме макроэргов, а также "углеродными скелетами" – интермедиатами цикла Кребса [19]. Пусть удельная скорость распада структур – μ_r , эффективность – q_{sr} . Для условий светового лимитирования и культуры невысокой плотности запишем:

$$\begin{cases} \mu = \frac{q_{rs} \mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat}} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} - \mu_r \\ \mu = \frac{\mu_m}{I_{sat} \varepsilon} \begin{cases} I_0, I_0 < I_{sat} \\ I_{sat}, I_0 \geq I_{sat} \end{cases} - \frac{\mu_{mrs}}{\varepsilon_{sat} \varepsilon} \begin{cases} \varepsilon, \varepsilon < \varepsilon_{sat} \\ \varepsilon_{sat}, \varepsilon \geq \varepsilon_{sat} \end{cases} + \frac{q_{sr} \mu_r}{\varepsilon} \end{cases}.$$

Зависимость соотношения ресурсных и структурных макромолекулярных форм от интенсивности света будет описываться выражением:

$$\varepsilon = -\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{cp})}, \quad (5)$$

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{1 - \frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}} + \sqrt{\left(\frac{1 - q_{rs} \varepsilon_{min}}{2q_{rs}}\right)^2 + \frac{\varepsilon_{min}}{q_{rs}} + \frac{\varepsilon_{min} \mu_m}{\mu_r} (i_0 - i_{cp})}}. \quad (6)$$

Таким образом, нами получены три математические модели, которые позволяют описать изменение величины относительного содержания хлорофилла *a* от облучённости для культур невысокой плотности. Модель 3 может быть дополнена уравнением для случая метаболического лимитирования, по аналогии с моделью 2. Однако полученное выражение будет идентично (4), при этом обобщённый параметр ε_{max} будет также связан с коэффициентом перехода структурной биомассы в резервную. Модели 1 и 3 близки по форме записи, отличие состоит в подкоренном выражении, что важно при расчёте видоспецифичных коэффициентов. Модель 2 применима только в узком диапазоне интенсивностей света, которые близки к насыщающим.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проанализируем кинетические коэффициенты, входящие в вышеуказанные модели.

Минимальное соотношение резервная / структурная биомасса ε_{min}

В "компенсационном пункте" соотношение резервных и структурных форм биомассы минимально, при этом доля структурных форм (β_m) будет максимальной:

$$\beta_m = \frac{1}{1 + \varepsilon_{min}}.$$

При длительном отсутствии света резервная форма биомассы вся перейдет в структурные формы, т. е. станет равной нулю, а содержание пигментов приблизится к своему предельному значению:

$$\varepsilon \rightarrow 0, \beta \rightarrow \beta_{\text{стр.}}$$

Таким образом, для оценки ε_{min} необходимо проанализировать данные по содержанию культур микроводорослей в темноте. Например, для цианопрокариоты *A. platensis*, которая находилась в темноте в течение 8 часов, общая потеря биомассы составила около 8 % [24]. Исходя из предположения, что за это время все резервные компоненты были исчерпаны, доля структурных форм составляет около 92 %. Согласно другим источникам [25], темновая потеря биомассы для этого же вида составляла около 14 %, доля структурных форм биомассы – 85 %. Таким образом, мы можем оценить параметр ε_{min} , величина которого находится в диапазоне 0.09–0.18.

Соотношение максимальной скорости фотосинтеза и скорости распада структуры

В культурах микроводорослей как на свету (наряду с фотосинтезом), так и в темноте, происходит эндогенный расход биомассы в результате "темнового дыхания". Основными функциями расхода биомассы в ходе эндогенного катаболизма являются энергетическое обеспечение процессов поддержания, а также обеспечение процессов фотобиосинтеза необходимыми АТФ, НАДФ·Н и углеродными скелетами. Соотношение интенсивности дыхания и фотосинтеза может быть выражено относительно расхода и биосинтеза биомассы. По литературным данным, этот параметр изменяется в широких пределах и составляет 0.05–0.65 для микроводорослей различных систематических групп [26, 27]. Изменение соотношения интенсивности дыхания и фотосинтеза обычно связывают с увеличением облучённости, различным содержанием основных биохимических компонентов. В контексте данной работы, так как мы рассматриваем максимальную удельную скорость фотосинтеза, соотношение $\mu_m : \mu_r$ является постоянным видоспецифическим коэффициентом и составляет около 20.

Экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную

Оценка величины q_{rs} является непростой задачей, которая требует рассмотрения многочисленных метаболических реакций в клетке. На сегодняшний день разрабатываются подходы для решения данного вопроса для гетеротрофов. Так расчёт, проведённый с использованием стационарной потоковой модели первичного метаболизма *Corynebacterium glutamicum*, дал максимальную величину экономического коэффициента образования лизина при росте продуцента на ацетате в 0.18 моль/моль [28]. Позднее, теоретически рассчитан наилучший возможный экономический коэффициент роста биомассы *E. coli* в аэробных условиях на глюкозе [29]. Авторами показано удовлетворительное согласие результатов моделирования (0.7) с данными, полученными в эксперименте (0.53).

Для культур микроводорослей оценку величины q_{rs} возможно осуществить при анализе экспериментальных данных изменения биохимического состава клеток в темноте. Например, по данным [25], для *A. platensis*, культивируемой при естественном освещении, за ночь происходило уменьшение количества углеводов и липидов, сопряжённое с увеличением содержания белка (см. табл. 1). Резервная биомасса, накопленная за световой день и состоящая из резервных углеводов и жиров, расходуется в ночное время на синтез структурных составляющих клеток. Примем, что к моменту окончания темного периода все резервные составляющие полностью окисляются. Это позволяет нам оценить стехиометрическое соотношение для структурной биомассы *A. platensis*:

$$\text{липиды} : \text{углеводы} : \text{белок} = 0.14 : 0.27 : 1.$$

Таблица 1. Изменение общего состава биомассы *A. platensis* в начале и конце светового промежутков времени по данным [25]

Компоненты	Содержание, мг·л ⁻¹		
	Восход	Заход	Восход
Органическое вещество	686	1165	998
Белок	486	666	707
Углеводы	133	394	195
Липиды	66	105	96

Отметим, что эти значения остаются постоянными в первое и второе утро эксперимента (при расчёте по первому и третьему столбцу табл. 1). Используя полученное соотношение, возможно рассчитать количество резервных углеводов и липидов к моменту окончания светового периода – 211.74 и 14.55 мг/л соответственно. Таким образом, экономический коэффициент перехода резервной биомассы в структурную, как отношение общего прироста структурных форм к убыли резервных, для культуры *A. platensis* составляет:

$$q_{rs} = \frac{\Delta B_{str}}{\Delta B_{res}} = \frac{59.3}{226.3} \cong 0.26.$$

Аналогичные расчёты для зелёной микроводоросли *Chlorella pyrenoidosa*, культивируемой в свето-темновом режиме при различных температурах [30], показали, что величина q_{rs} изменяется от 22 до 37 %.

Кроме того, коэффициент q_{rs} может быть косвенно оценён как отношение максимальной эффективности фотосинтеза к максимальной эффективности фотобиосинтеза. Известно, что основным продуктом фотосинтеза являются фосфолирированные сахара. Параллельно с ними могут образовываться азотистые и др. соединения, которые можно рассматривать как резервную часть биомассы. Максимальный КПД фотосинтеза составляет около 30–35 % [19]. Продукты фотосинтеза в дальнейшем используются как энергетический и пластический субстрат для биосинтеза. По данным [31] для *Synechococcus elongatus* максимальная эффективность фотобиосинтеза не превышает 15 %. Таким образом, величина q_{rs} составляет около 40 %.

Насыщающая и компенсационная интенсивности света

В моделях, приведённых в данной работе, интенсивность света представлена в нормированном на насыщающую (I_{sat}) виде. Величина I_{sat} может быть определена из конкретных экспериментальных данных. При достижении облучённостью величины I_{sat} скорость образования резервных форм биомассы достигает максимума, при этом соотношение резервная / структурная биомасса также становится максимальным, а доля структурных форм – минимальна.

Величина интенсивности света в "компенсационном пункте" фотосинтеза также может быть определена из экспериментальных данных: при уменьшении светового потока доля структурных форм биомассы (хлорофилла *a*) возрастает, достигая максимума при некоторой интенсивности I_{cp} . Дальнейшее снижение облучённости приводит к преобладанию катаболических процессов распада биомассы над фотосинтезом и, как следствие, к резкому падению содержания пигментов в клетках микроводорослей [32]. При описании экспериментальных данных интенсивность света I_{cp} также удобно представлять в нормированном на насыщающую виде – i_{cp} . Величина i_{cp} может быть выражена через кинетические параметры культуры (см. модель 1).

Верификация моделей

В качестве примера, рассмотрим экспериментальные данные зависимости относительного содержания хлорофилла a в биомассе *A. platensis* [33] при малых и больших облучённостях на различных источниках света (см. рис. 2,А). Отметим более высокую скорость уменьшения количества хлорофилла a в биомассе спирулины на люминесцентных лампах. Согласно предлагаемому подходу, видоспецифические коэффициенты предложенных уравнений, а именно, ε_{\min} , q_{rs} , μ_m , μ_r , не могут изменяться при освещении клеток культуры различными лампами. Единственный параметр, который может определяться спектральными характеристиками источника света является насыщающая облучённость I_{sat} , при которой скорость образования резервных форм биомассы (скорость фотосинтеза) достигает максимума. Можно показать, что I_{sat} зависит от количества ключевого регулятора энергообменных реакций F_0 ("лимитирующее звено"), его активности μ_e , и числа молекул макроэрга (АТФ или НАДФ·Н), восстанавливаемых за счёт одного кванта φ_e :

$$I_{\text{sat}} = \frac{\mu_e \cdot F_0}{\varphi_e}.$$

Для культур микроводорослей известно [34, 35], что спектральный состав света во многом определяет не только пигментный, но и биохимический состав биомассы. Следовательно, изменения в спектральном распределении световой энергии неминуемо скажутся на одном из параметров, которые определяют I_{sat} .

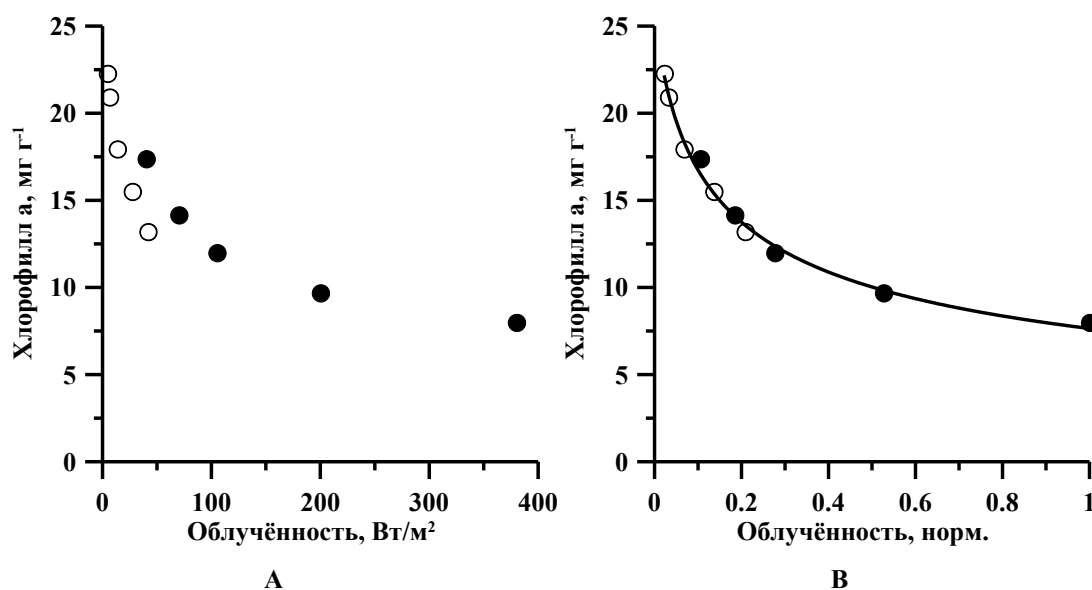


Рис. 2. А – Зависимость относительного содержания хлорофилла a от облучённости для плотностатной культуры *A. platensis* для двух типов ламп: \circ – люминесцентные лампы ЛЦ-40, \bullet – галогенная лампа КГ 220-1000-3 [33]. В – нормированные данные (пояснения в тексте), линия – аппроксимация моделью 1 и 3.

При рассмотрении экспериментальных данных зависимости содержания хлорофилла a от облучённости в нормированном виде (нормировка выполняется на I_{sat}), кинетические кривые, полученные на различных источниках света для конкретного вида микроводорослей, должны совпадать. Действительно, при нормировке интенсивности света для лампы КГ 220-1000-3 на максимальное значение 380 Вт/м^2 , а для люминесцентных ламп – 200 Вт/м^2 , все точки легли на одну кривую (см. рис. 2,В). Данные значения нормирующих множителей следует рассматривать как оценочные, которые могут быть уточнены при большем количестве экспериментальных точек.

Аппроксимация данных предложенными моделями позволила определить кинетические коэффициенты уравнений (см. рис. 2,В). Так как область применимости модели 2 – диапазон высокой интенсивности света, для которой количество экспериментальных точек крайне мало, то при математической обработке использовали только уравнения (2) и (6). Из рисунка 2,В видно, что обе предлагаемые модели с одинаковой точностью ($R^2 = 0.99$) описывают экспериментальные значения, причём обе кривые совпадают. В качестве начальных значений для расчётов коэффициентов моделей были использованы величины, приведённые выше. Полученные результаты представлены в таблице 2. Количественно все коэффициенты соответствуют ранее определённым диапазонам с некоторыми отклонениями. Для модели 1 отношение максимальной удельной скорости фотосинтеза к удельной скорости распада структур в три раза превышает известные для микроводорослей данные. Более точные значения коэффициентов могут быть получены при большем количестве экспериментальных точек.

Таблица 2. Кинетические коэффициенты культуры *A. platensis* при аппроксимации экспериментальных данных [33] моделями 1 и 3

	ε_{\min}	q_{rs}	μ_m / μ_r	μ_r / μ_m	β_{str}	i_{cp}
Модель 1	0.11	0.4	69.44	0.01	25.75	0.02
Модель 3	0.24	0.79	26	0.04	23.05	0.06

В основе всех предложенных в данной работе математических моделей лежит общее представление о разделении фотосинтетических и биосинтетических процессов в клетках низших фотоавтотрофов. Кинетические коэффициенты полученных уравнений можно интерпретировать как видоспецифические. Однако на текущий момент количество накопленного экспериментального материала для плотностатных культур микроводорослей невелико и представлено единичными работами [32, 33, 36]. Это обстоятельство затрудняет возможность точного расчёта данных параметров для различных видов. Учитывая, что форма зависимости содержания хлорофилла от света одинакова практически для всех классов и видов морских микроводорослей [6], и предполагая постоянство коэффициентов моделей (см. таблицу 2), запишем приближённое уравнение светозависимого содержания хлорофилла a от облучённости в культурах микроводорослей невысокой плотности:

$$\beta = \frac{\beta_{str}}{0.487 + \sqrt{0.567 + 6.242(i_0 - 0.06)}}. \quad (7)$$

На рисунке 3 представлено описание экспериментальных данных приближённым уравнением (7) для зелёных морских микроводорослей *Dunaliella tertiolecta* по данным [32] и *Tetraselmis (Platymonas) viridis* по данным [36]. Точность описания по критерию R^2 составила 92 и 98 % соответственно. Доля хлорофилла a в структурной форме биомассы для *T. viridis* составила 2.55 % или 25.5 мг/г, что практически совпадает с расчётом для *A. platensis*. β_{str} для культуры *D. tertiolecta* составила $39.68 \cdot 10^{-16}$ моль на клетку. Аналогичные расчёты для диатомеи *Skeletonema costatum* [32] и зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* [31] показали более низкую точность описания ($R^2 = 0.8$). Величина β_{str} для данных видов равнялась $11.7 \cdot 10^{-16}$ моль на клетку и 3.48 % соответственно. Таким образом, доля хлорофилла a в структурной биомассе, вероятно, является видоспецифическим коэффициентом, точная оценка которого требует большого объёма экспериментального материала.

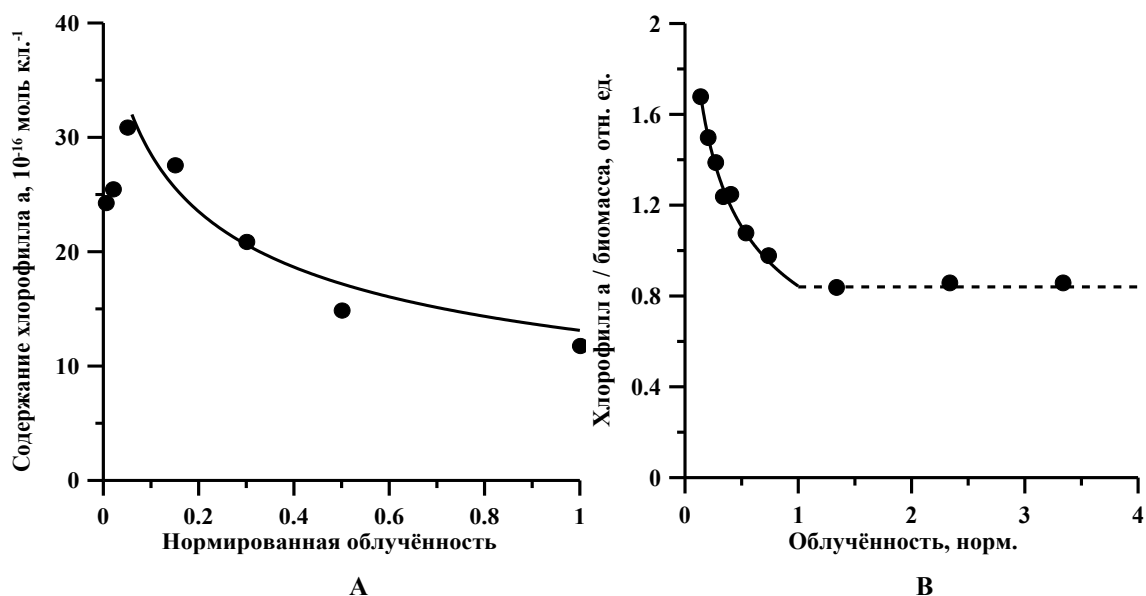


Рис. 3. А – Содержание хлорофилла *a* в клетках плотностатной культуры *D. tertiolecta* по данным [32]. В – зависимость содержания хлорофилла *a* в биомассе *T. viridis* по данным [36]. Сплошная линия – аппроксимация данных уравнением (7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для культур микроводорослей предложена группа моделей светозависимого содержания хлорофилла *a* от облучённости. Предполагая, что хлорофилл *a* относится к структурным формам биомассы, при моделировании использованы ранее полученные уравнения зависимости соотношения структурных и резервных форм биомассы от интенсивности света. Скорости синтеза структурных и резервных форм биомассы заданы линейными сплайнами. В области светового лимитирования скорость образования резервных форм линейно зависит от внешней интенсивности света, поэтому применимость моделей ограничена культурами невысокой оптической плотности. Кроме того, при выводе уравнений предполагается равенство удельных скоростей образования резервных и структурных форм биомассы, что возможно только в стационарном динамическом равновесии проточной культуры. Предлагаемый подход не учитывает возможных процессов фотодеструктивного окисления хлорофилла *a*.

Верификация полученных уравнений для различных вариантов лимитирования позволила оценить величины кинетических коэффициентов, значения которых в целом соответствуют рассчитанным диапазонам. Недостаточное количество экспериментальных точек не позволяет сделать вывод о предпочтительности той или иной модели. Исходя из общности предлагаемого подхода, сделано предположение о постоянстве кинетических коэффициентов моделей для различных видов микроводорослей. Получено простое приближённое уравнение, которое может быть использовано при оценочных расчётах содержания хлорофилла *a* в зависимости от внешней интенсивности света.

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН», № гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finenko Z.Z., Hoepffner N., Williams R., Piontkovski S.A. Phytoplankton carbon to chlorophyll *a* ratio: response to light, temperature and nutrient limitation. *Морской экологический журнал*. 2003. Т. 2. № 2. С. 40–64.

2. Чурилова Т.Я., Кривенко О.В., Суслин В.В., Ефимова Т.В., Моисеева Н.А. Первичная продукция Чёрного моря: спектральный подход. *Морской биологический журнал*. 2016. Т. 1. № 3. С. 50–53.
3. Ковалёва И.В., Финенко З.З. Количественные закономерности изменения относительного содержания хлорофилла при совместном действии света и температуры у диатомовых водорослей. *Вопросы современной альгологии*. 2019. № 3. С. 28–36. doi: [10.33624/2311-0147-2019-3\(21\)-28-36](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-3(21)-28-36).
4. Nielsen S., Jorgensen E. The adaptation of plankton algae. 1. General part. *Physiol. Plantarum*. 1968. V. 21. P. 401–413.
5. Richardson K., Beardall J., Raven J. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* 1983. V. 93. P. 157–191.
6. Macintyre H.L., Kana T.M., Anning T., Geider R.J. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 2002. V. 38. P. 17–38. doi: [10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00094.x).
7. Холл Д., Рао К. *Фотосинтез*. М.: Мир, 1983. 133 с.
8. Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. *Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты*. М.: Академия, 2006. 448 с.
9. Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Тренкеншу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях азотного питания. *Экология моря*. 2002. Т. 62. С. 61–66.
10. Borovkov A.B. Gudvilovich I.N. growth and biochemical indices of *Dunaliella salina* under conditions of batch culture. *Hydrobiol. Journ.* 2013. V. 49. No 2. P. 75–84.
11. Geider R.J. Light and temperature dependence of the carbon to chlorophyll a ratio in microalgae and cyanobacteria: implications for physiology and growth of phytoplankton. *New Phytol.* 1987. V. 106. № 1. P. 1–34. doi: [10.1111/j.1469-8137.1987.tb04788.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04788.x).
12. Cloern J.E., Grenz C., Vidergar-Lucas L. An empirical model of the phytoplankton chlorophyll:carbon ratio – the conversation between productivity and growth. *Limnol. Oceanogr.* 1995. V. 40. № 7. P. 1310–1321. doi: [10.4319/lo.1995.40.7.1313](https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.7.1313).
13. Geider R.J., MacIntyre H.L., Kana T.M. A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrient and temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 1997. V. 148. P. 187–200.
14. Геворгиз Р.Г., Тренкеншу Р.П. Светозависимое содержание пигментов в микроводорослях. Стационарный процесс. *Альгология*. 1998. Т. 8. № 3. С. 273–277.
15. Боровков А.Б. Математическая модель светозависимого содержания пигментов в клетках микроводорослей для стационарного динамического равновесия хемостатной культуры. *Экология моря*. 2010. Т. 80. С. 17–24.
16. Goericke R., Welschmeyer N.A. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. 1. The ¹⁴CO₂-labeling kinetics of chlorophyll a. *J. Phycol.* 1992. V. 28. P. 498–507. doi: [10.1111/j.0022-3646.1992.00498.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00498.x).
17. Тренкеншу Р.П. Влияние света на макромолекулярный состав микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности (Часть 1). *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 2. URL: <http://algology.ru/1180> (дата обращения: 18.09.2020).
18. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Фундаментальные принципы моделирования фотобиосинтеза микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*. 2018. Т. 18. № 3. doi: [10.33624/2311-0147-2018-3\(18\)-1-10](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2018-3(18)-1-10).
19. *Физиология растений: Уч. для студ. вузов*. Под ред. Ермакова И.П. М.: Изд-во «Академия», 2005. 640 с.
20. Рубин А.Б., Кренделева Т.Е. Регуляция первичных процессов фотосинтеза. *Успехи биологической химии*. 2003. Т. 43. С. 225–266.
21. Медведев С.С. *Физиология растений: учебник*. С.-Пб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2004. 336 с.

22. Ивлев А.А. Колебательная природа углеродного метаболизма в фотосинтезирующей клетке по данным изотопного состава углерода. *Успехи современной биологии*. 2011. Т. 131. № 2. С. 178–192.
23. Тренкеншу Р.П. Влияние света на макромолекулярный состав микроводорослей в непрерывной культуре невысокой плотности (Часть 2). *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 3. URL: <http://algology.ru/1241> (дата обращения: 18.09.2020).
24. Авсиян А.Л. Динамика потери биомассы в культуре *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Суанопрокарыота) в темновых условиях. *Альгология*. 2014. Т. 24. № 3. С. 417–420.
25. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R., Richmond A. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *J. Appl. Phycol.* 1991. V. 3. P. 103–109.
26. Geider R.J., Osborne B.A. Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. *New phytol.* 1989. V. 112. № 3. P. 327–341. doi: [10.1111/j.1469-8137.1989.tb00321.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1989.tb00321.x).
27. Langdon C. The significance of respiration in production measurements based on oxygen. *ICES Mar. Sci. Symp.* 1993. V. 197. P. 69–78.
28. Drozdov-Tikhomirov L.N, Scurida G.I, Serganova V.V. Inner metabolic fluxes in multienzyme systems: lysine synthesis on acetate by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnologia (Moscow)*. 1986. V. 2. No 8. P. 28–37.
29. Назипова Н.Н., Елькин Ю.Е., Панюков В.В., Дроздов-Тихомиров Л.Н. Расчёт скоростей метаболических реакций в живой растущей клетке методом баланса стационарных метаболических потоков (метод БСМП). *Математическая биология и биоинформатика*. 2007. Т. 2. № 1. С. 98–119. doi: [10.17537/2007.2.98](https://doi.org/10.17537/2007.2.98).
30. Ogbonna J.C., Tanaka H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Ferm. Bioeng.* 1996. V. 82. No. 6. P. 558–564.
31. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкеншу А.П. *Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей*. Новосибирск: Наука, 1980. 136 с.
32. Falkowski P.G., Owens T.G. Light-shade adaptation: two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 1980. V. 66. P. 592–595.
33. Заворуева Е.Н., Заворуев В.В., Крум С.П. *Лабильность первой фотосистемы фототрофов в различных условиях окружающей среды*. Красноярск: Сибирский федеральный университет, 2011. 152 с.
34. Kozel N.V., Domanskii V.P., Manankina E.E., Adamchyk K.O., Dremuk I.A., Savina S.M. The influence of the spectral composition of the led lighting on the structure of the photosynthetic apparatus of *Spirulina platensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2015. № 2. P. 44–49 (in Russ.).
35. Ефимова Т.В. Влияние спектрального состава света на содержание пигментов в клетках микроводорослей. *Морской экологический журнал*. 2011. № 2. С. 22–28.
36. Терсков И.А., Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Светозависимый рост водоросли *Platyonas viridis* в непрерывной культуре. *Известия Академии наук СССР. Серия биологическая*. 1981. Т. 2. № 10. С. 103–108.

Рукопись поступила в редакцию 06.05.2020, переработанный вариант поступил 14.09.2020.
Дата опубликования 23.09.2020.

Modeling Of Chlorophyll a Content in Microalgae Cultures

Lelekov A.S., Trenkenshu R.P.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Russia

Abstract. The work focuses on mathematical modeling of light influence mechanisms on chlorophyll *a* content in microalgae biomass. The well-known qualitative models are based on concepts of synthesis and photodestructive oxidation of chlorophyll *a*, however the later for some microalgae species seems doubtful. We proposed an alternative approach to modeling the light-dependent chlorophyll *a* content in microalgae biomass. The basic model is based on generally accepted two-stage photoautotrophic growth of microalgae. At the first stage, during photosynthesis a reserve part of biomass is formed, from which the biosynthesis of cell structures occurs at the second stage. Three partial solutions of the basic system of equations describing the dependence of chlorophyll *a* content on the external light intensity are considered for various limiting conditions. Due to the equality of specific growth rates of formation of reserve and structural forms of biomass, the equations obtained can be used only for turbidostat cultures. Verification of the obtained equations for *Arthrospira platensis* allows us to estimate kinetic coefficients, the values of which are generally in good agreement with theoretically calculated ones. For approximate calculations, a simple equation is proposed that shows a good agreement with experimental data for *Tetraselmis viridis* ($R^2 = 0.98$), *Dunaliella tertiolecta* ($R^2 = 0.92$) and describes the results for *Skeletonema costatum* and *Chlorella vulgaris* ($R^2 = 0.8$) quite well. Chlorophyll *a* refers to structural forms of biomass. The proportion of chlorophyll *a* in the structural biomass is about 2.5–3.5 %, it is a species-specific parameter.

Key words: *microalgae culture, turbidostat, chlorophyll a, light conditions, photobiosynthesis.*