



УДК 582.261.1:551.464.6

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
МОРСКОЙ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ  
*CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN  
В ИНТЕНСИВНОЙ КУЛЬТУРЕ  
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКАХ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

© 2019 г. С. Н. Железнова

Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия  
E-mail: [zheleznovasveta@yandex.ru](mailto:zheleznovasveta@yandex.ru)

Поступила в редакцию 16.07.2018; после доработки 20.08.2018;  
принята к публикации 18.03.2019; опубликована онлайн 31.03.2019.

Диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin характеризуется высокой продуктивностью (до  $1,5 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ) и способностью накапливать ценный каротиноид фукоксантин (до 2 % от сухой массы). Азот является одним из важнейших компонентов в питательной среде, существенно влияющих на продукционные характеристики микроводорослей. Цель работы — сравнить продукционные характеристики *C. closterium* при использовании разных форм азота в питательной среде в интенсивной накопительной культуре. В первом эксперименте источником азота служили нитрат и нитрит натрия, мочевины, азот в аммонийной форме. Отношение азота к фосфору (N:P) составляло 15:1. Во втором эксперименте источником азота служили аргинин, аспарагин и цистеин. Показана возможность использования диатомеей *C. closterium* для своего роста различных органических источников азота: мочевины, цистеина, аспарагина. Определены продукционные характеристики в интенсивной накопительной культуре *C. closterium* при применении мочевины, цистеина и аспарагина в качестве единственного источника азота в питательной среде RS. Показано, что при добавлении мочевины продуктивность достигала своих максимальных величин —  $1,5 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . Использование цистеина в стационарной фазе роста также целесообразно для увеличения времени этой фазы при минимальных концентрациях источника азота в питательной среде. Установлено, что *C. closterium* способна расти и вегетировать при достаточно высоких концентрациях нитрита; добавление азота в аммонийной форме в питательную среду во время активного роста водоросли приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и к гибели культуры. При выращивании диатомеи для получения максимального выхода биомассы целесообразно применять мочевины в качестве дополнительного источника азота: именно при её добавлении зафиксированы максимальная продуктивность микроводоросли и продолжительная стационарная фаза роста, способствующая дальнейшему синтезу фукоксантина в культуре.

**Ключевые слова:** диатомовая морская водоросль *Cylindrotheca closterium*, продуктивность, аминокислоты, мочевины, азот, нитраты, нитриты, аммоний

Диатомовые водоросли — древнейшие организмы, возникшие в результате вторичного эндосимбиоза; они обладают гибким метаболизмом, что позволяет им выживать в неблагоприятных условиях среды обитания [18]. Диатомеи могут приспосабливаться к таким условиям благодаря особенностям своего биосинтеза и накоплению в клетках физиологически активных соединений: полиненасыщенных жирных кислот, каротиноидов, металлорганических соединений и т. п. [21, 26].

Именно способность к биосинтезу данных соединений явилась причиной повышенного интереса современной биотехнологии к диатомеям, в особенности к морским видам. Среди многих диатомовых — продуцентов ценных веществ — следует выделить бенто-планктонную морскую водоросль *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. Она характеризуется высокой продуктивностью (до  $1,5 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ), и способностью накапливать ценный каротиноид морского происхождения фукоксантин (до 2 % от сухой массы), полиненасыщенные жирные кислоты [26], йод [14], а также железо и другие металлы в органической форме [7].

При разработке биотехнологий на основе микроводорослей ключевым вопросом является создание питательных сред со значительными, но оптимальными для данной культуры концентрациями биогенных элементов. Для интенсивного культивирования *C. closterium* разработаны питательные среды [4], применение которых обеспечивает высокую продуктивность плотных культур как в лабораторных, так и в промышленных фотобиореакторах. Плотные культуры при определённых условиях могут не достигать своей максимальной продуктивности [1]. Для высокой степени накопления ценных веществ в биомассе важны не только концентрации биогенных элементов, но и их соотношение. Так, максимальное накопление фукоксантина возможно лишь при отношении азота к фосфору 15 : 1 [3].

Кроме концентраций и соотношений биогенных элементов в питательной среде, существенным параметром является степень эффективности усвоения биогенных элементов. Известно, например, что клетки микроводорослей поглощают азот как в нитратной, нитритной и аммонийной, так и в органической форме [16]. Углерод и азот — важнейшие компоненты в питательной среде, существенно влияющие на продукционные характеристики микроводорослей. Особый интерес представляют органические источники азота — аминокислоты, а также мочевины и её производные. Субстраты органического азота могут служить также источниками углерода, обеспечивая потребности в нём диатомовых водорослей. Наличие органических источников азота даёт возможность водорослям потреблять уже готовые углеводородные скелеты для биосинтеза, увеличивая свою скорость роста [15, 22].

Цель работы — сравнить продукционные характеристики диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* при использовании разных форм азота в питательной среде в интенсивной накопительной культуре.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали диатомею *Cylindrotheca closterium* из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей Института морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН (ФГБУН ИМБИ, г. Севастополь). *C. closterium* адаптировали к условиям интенсивного культивирования, используя питательную среду RS [4], при круглосуточном освещении 13 клк и при постоянной температуре ( $20 \pm 1$ ) °С. После адаптации культуру применяли как инокулят для дальнейших исследований. Во всех экспериментах *C. closterium* выращивали в режиме накопительного культивирования [3, 4]; использовали питательную среду RS с различными источниками азота с расчётом всех биогенных элементов на максимальную плотность культуры  $3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ . Концентрации биогенных элементов среды RS [4] приведены с расчётом на 1 г сухой массы. Культура была не лимитирована по свету.

В первом эксперименте в качестве источника азота использовали нитрат и нитрит натрия, мочевины и азот в аммонийной форме. Количество нитратов, нитритов, аммония и мочевины в питательной среде рассчитывали, исходя из содержания азота в ней; отношение азота к фосфору составляло 15 : 1. Экспериментально исследовали влияние азота в аммонийной форме на *C. closterium*, добавляя сульфат аммония, нитрат аммония или карбонат аммония в питательную среду во время активного роста культуры.

Во втором эксперименте в качестве источника азота использовали аминокислоты — аргинин, аспарагин и цистеин. Количество аспарагина и цистеина в питательной среде также рассчитывали, исходя из содержания азота в ней. При добавлении цистеина в питательную среду отношение азота к фосфору составляло 6 : 1. Аргинин и аспарагин добавляли в среду в пересчёте на отношение азота к фосфору 15 : 1.

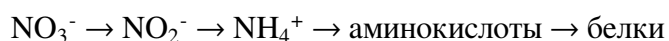
Плотность культуры определяли двумя методами: 1) методом йодатной окисляемости биомассы [2]; 2) прямым взвешиванием сырой биомассы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах САУУ-120 с погрешностью 1 мг после осаждения клеток центрифугированием (1600 г в течение 2 минут). При определении доверительного интервала использовали среднее квадратическое отклонение значений аликвот биомассы культуры объёмом 10 мл.

Для пересчёта полученных данных на сухую массу применяли полученный нами ранее экспериментальный коэффициент связи между сухой и сырой массой ( $k = 0,1$ ) [3, 4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что продуктивность плотных культур микроводорослей при использовании разных источников азота отличается, несмотря на наличие у диатомей в плазмалемме переносчиков практически всех форм азота [6, 12] и на способность клеток поглощать азот из околочлещной среды. Это можно объяснить специфической особенностью переносчиков азота у диатомовых водорослей, разным временем оборота ферментов, различной концентрацией ферментов-переносчиков в биомассе, а также неодинаковыми скоростями процессов и длительностью метаболических путей азота в клетке.

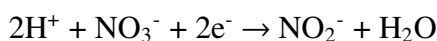
С использованием литературных данных нами разработана схема метаболических путей азота в клетках диатомовых водорослей (рис. 1). У диатомей восстановление азота происходит в несколько этапов [6, 12]:

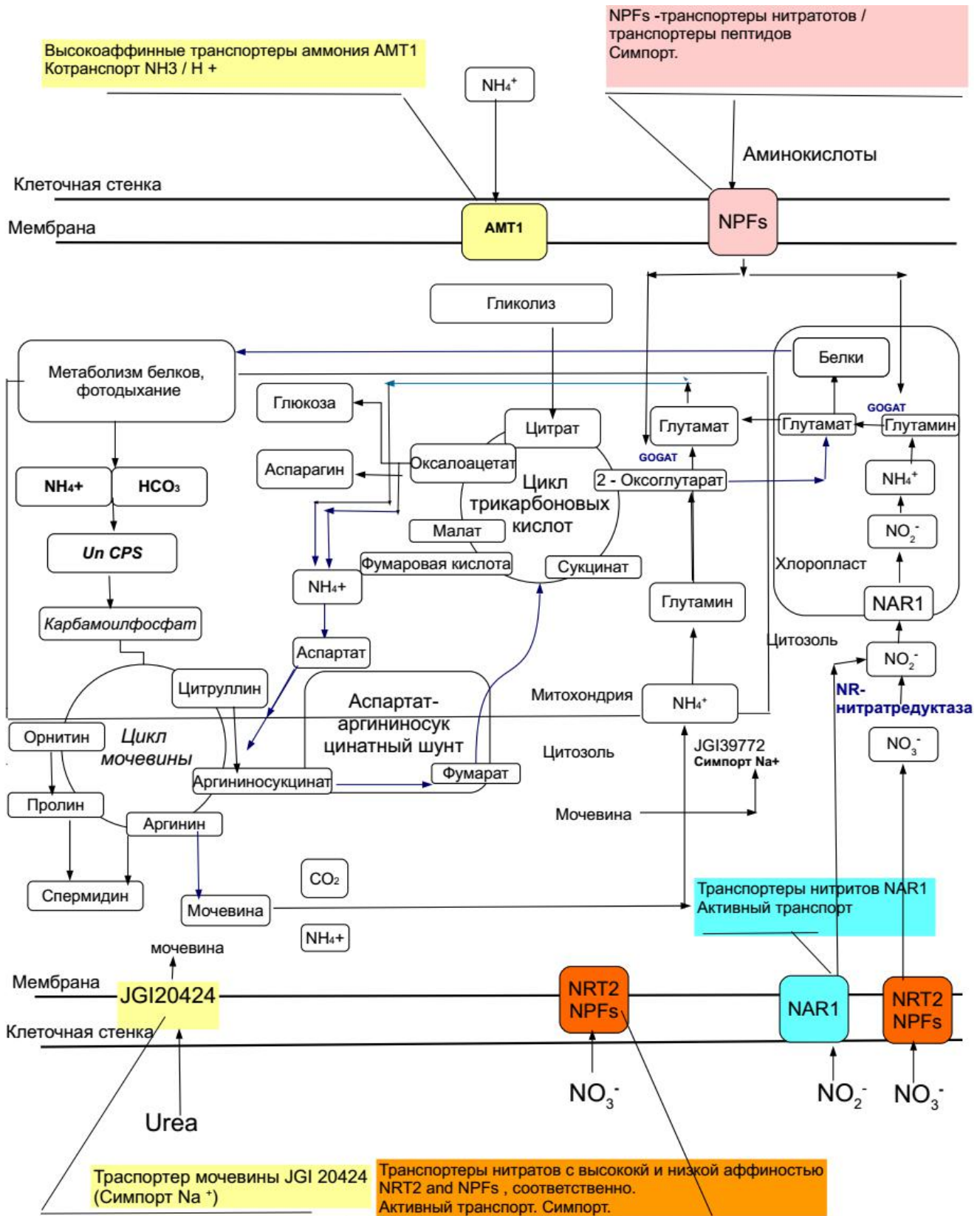


Диатомовые водоросли способны ассимилировать как окисленный, так и восстановленный азот [8]. Его различные формы проникают в клетку диатомей благодаря специфическим ферментам-переносчикам [20]. Диатомовые способны ассимилировать нитраты, нитриты, аммоний, мочевины и аминокислоты [16, 17].

**Нитратная форма азота.** Исследование динамики плотности накопительной культуры *C. closterium* при использовании в качестве источника азота нитрата натрия показало, что плотность культуры достигла расчётного максимального значения (количество биогенных элементов в питательной среде вычисляли на 3 г сухой массы) и составила  $3,2 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1}$  (рис. 2). Наибольшая продуктивность (максимальный прирост биомассы за одни сутки, измеряемый в граммах сухой массы водоросли на литр среды) зафиксирована на четвёртые сутки культивирования —  $1,45 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ . В нашем случае у кривой роста присутствует длительная стационарная фаза. Это можно объяснить тем, что нитрат натрия поглощается клеткой водоросли за счёт специальных транспортных белков NRT2 и NPFs, выполняющих активный перенос нитрат-ионов и протонов ( $\text{H}^+$ ) и регулирующих градиент pH [24, 25]. Когда эти белки-транспортёры ингибированы аммонийной формой азота или находятся в неактивном состоянии, длительная стационарная фаза не наблюдается.

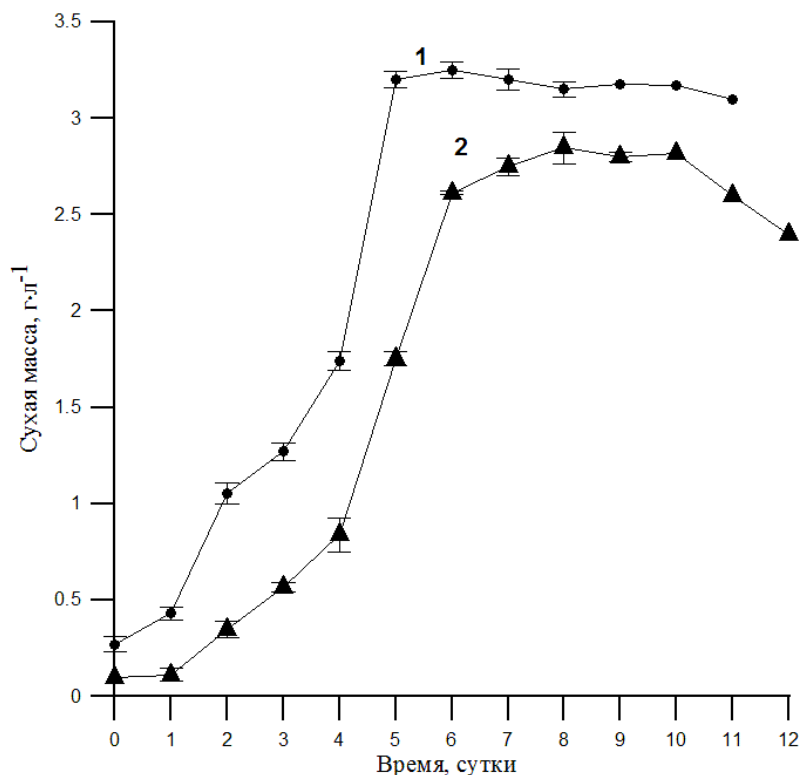
Из рис. 1 следует, что нитратная форма азота транспортируется через мембрану, а затем за счёт работы цитозольной NADH-зависимой нитратредуктазы (далее — NR) восстанавливается до нитрит-иона:





**Рис. 1.** Поглощение и пути метаболизма различных форм азота в клетках диатомовых водорослей (оригинальная схема с использованием литературных источников [5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25])

**Fig. 1.** Absorption and metabolic pathways of various forms of nitrogen in diatom cells (original scheme using sources [5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25])



**Рис. 2.** Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* при выращивании на среде RS при использовании нитрата натрия (1) и нитрита натрия (2) в качестве источников азота

**Fig. 2.** Density dynamics of *C. closterium* storage culture on RS nutrient medium using sodium nitrate (1) and sodium nitrite (2) as sources of nitrogen

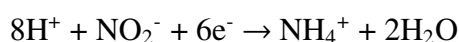
Нитрит-ион далее переносится в хлоропласт и восстанавливается до аммония с помощью ферредоксин-зависимой нитритредуктазы (далее — Fd-NIR) [9]. Белки NRT2, обладающие высоким уровнем сродства с нитратной формой азота, имеют 12 трансмембранных сегментов и функционируют как котранспортёры нитрат-ионов и протонов, проявляющие свою активность при достаточно низких концентрациях нитратного азота. У пеннатной диатомовой водоросли *P. tricornutum* идентифицировано шесть белков-транспортёров NRT2, тогда как у центрической диатомеи *T. pseudonana* — три белка семейства NRT2 [23, 24, 25]. Белки NPF — семейство низкоаффинных переносчиков нитрат-ионов, которые, в отличие от своих животных и бактериальных аналогов, транспортируют широкий спектр субстратов в растениях:  $\text{NO}_3^-$ , ди- и трипептиды, аминокислоты, дикарбоксилаты, глюкозинолаты, ауксин и абсцизиновую кислоту [24]. Важно отметить, что активность транспортёров NRT2 и NPFs ингибируется (блокируется) ионами  $\text{NH}_4^+$ . При концентрации аммония выше 1 мкМ поглощение нитрат-ионов прекращается [25].

**Нитритная форма азота.** Анализ результатов по динамике плотности накопительной культуры *C. closterium* при использовании в качестве источника азота нитрита натрия показал, что максимальная плотность культуры достигла расчётных величин, составив  $2,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  сухой биомассы (рис. 2). Наибольшая продуктивность отмечена на четвёртые сутки культивирования ( $1 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ). Скорость роста водорослей при использовании нитритов в питательной среде ниже, чем при использовании нитратов. Следовательно, восстановление нитратного азота до нитритного не является узким местом метаболизма клеток в целом.

Известно, что присутствие нитрит-ионов в питательной среде губительно для многих фототрофов, однако, по нашим данным, даже высокие концентрации нитрита натрия в среде (более  $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ ) не угнетают рост клеток *C. closterium*. Это объясняется наличием специфического фермента — нитритредуктазы. Fd-NIR представляет собой белок, который содержит гем серы и кластер



железа (4Fe–4S), катализирующий шестиэлектронное восстановление  $\text{NO}_2$  до  $\text{NH}_4^+$  [19]. У диатомовых водорослей физиологический донор электронов — ферредоксин — восстанавливается за счёт светозависимого переноса электронов в хлоропластах [27]. Снижение фотосинтетического электронного потока к ферредоксину в клетках из-за лимитирования железа в питательной среде может ограничить ассимиляцию  $\text{NO}_3^-$  [19]. Fd-NIR восстанавливает нитрит до аммиака, который затем может служить субстратом для глутаминсинтетазного/глутаматсинтетазного цикла (GS/GOGAT цикла) или для цикла мочевины [25]:



Таким образом, за счёт работы ферментов NR и Fd-NIR происходит восстановление неорганических форм азота до  $\text{NH}_4^+$ .

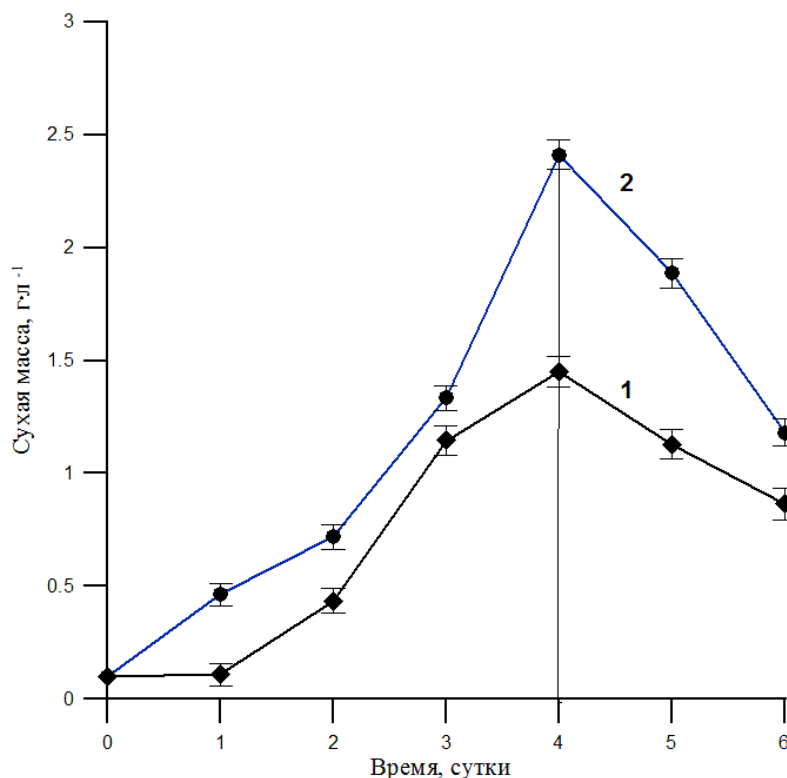
На основании вышесказанного можно предположить, что продуктивность культуры диатомовых при добавлении нитритного азота в питательную среду будет выше, чем при добавлении нитратного, так как для восстановления азота до аммиака требуется меньше стадий и энергии. Однако, по нашим данным, максимальная скорость роста культуры в заданных условиях ниже. Важно отметить, что аммонийная форма азота ингибирует ферментную активность Fd-NIR, а также подавляет синтез этого фермента на уровне экспрессии генов [9]. Для кривых роста, полученных при использовании в питательной среде нитритов и нитратов в качестве единственных источников азота, характерна длительная стационарная фаза роста (рис. 2).

**Аммонийная форма азота.** Для многих растительных организмов предпочтительным является азот в аммонийной форме. В отношении диатомовых наблюдается обратная картина: даже малые концентрации аммония в среде ингибируют рост культуры и приводят к гибели клеток. Экспериментально показано, что добавление аммония в количестве более  $20 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$  в питательную среду во время активного роста *C. closterium* ведёт к ингибированию всех процессов метаболизма и к гибели культуры (рис. 3). Аналогичные результаты получены в работе [20]. Аммоний вызывает гибель клеток *C. closterium* даже при наличии в питательной среде других форм азота.

Азот в аммонийной форме — важный ион, вовлечённый во многие внутриклеточные процессы (рис. 1). Аммоний, включаясь в глутаминсинтетазный/глутаматсинтетазный путь (GS/GOGAT путь), ассимилируется в аминокислоты [11]. Аммоний включается в цикл мочевины, в результате чего она синтезируется эндогенно [5, 6]. Он играет существенную роль во многих биохимических реакциях, протекающих в хлоропластах и митохондриях. Аммонийная форма азота — общий промежуточный продукт для неорганического восстановления азота, а глутамин и глутамат — первичные продукты ассимиляции азота. Эти распространённые промежуточные соединения имеют большое значение для регулирования поглощения и ассимиляции азота посредством обратной связи от пулов продуктов и соотношения глутамин : глутамат [24].

Аммоний проникает в клетку диатомовых благодаря транспортёрам подсемейства AMT1 — каналоподобным белкам. Они действуют как унипортёры  $\text{NH}_4^+$  или как котранспортёры  $\text{NH}_3 / \text{H}^+$  [24, 29]. Транспортёры подсемейства AMT1 обладают высокой аффинностью (степень сродства с аммонийной формой азота), но при достижении оптимальных концентраций аммония в цитозоле прекращают перенос и поглощение  $\text{NH}_4^+$  [24]. Эти транспортёры содержат 11 предполагаемых трансмембранных доменов и имеют общую эволюционную историю с семейством переносчиков  $\text{NH}_4^+$  зелёных водорослей — Rh- $\text{NH}_4^+$ -транспортёров. У *P. tricornutum* и *C. closterium* обнаружено восемь белков — транспортёров AMT1 [24].

Токсичность аммония для *C. closterium* можно объяснить тем, что аммонийная форма азота подавляет активность NR, ингибирует работу транспортёров нитрат- и нитрит-ионов из околклеточной среды в клетку. Если концентрация аммония превышает  $20 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ , у диатомовых водорослей наблюдается низкая активность NR или её отсутствие из-за подавления синтеза NR на уровне экспрессии гена [10]. При малых концентрациях аммония в среде (менее  $20 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) диатомеи растут



**Рис. 3.** Динамика плотности культуры *C. closterium* при использовании различных источников азота: 1 — нитрат натрия (сплошной тонкой линией обозначен момент добавления нитрата аммония); 2 — мочевина (сплошной тонкой линией показан момент добавления сульфата аммония)

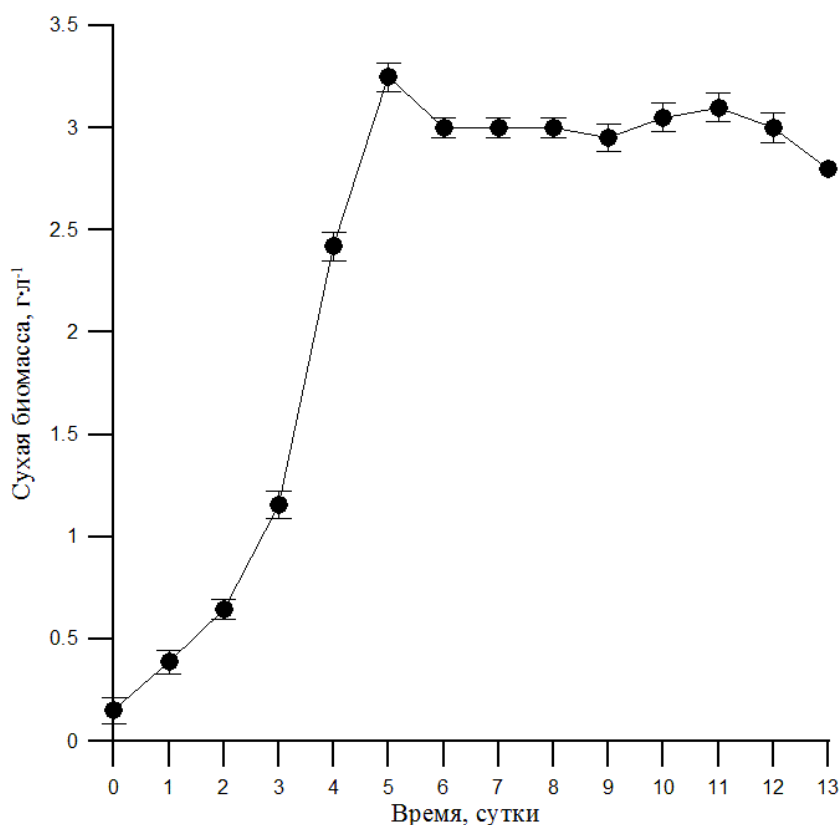
**Fig. 3.** The density dynamics of *C. closterium* using various nitrogen sources: 1 – sodium nitrate (the solid line indicates the moment of addition of ammonium nitrate); 2 – urea (the solid line indicates the time of addition of ammonium sulfate)

и вегетируют, но при такой обеспеченности клеток азотом получить плотную интенсивную культуру практически невозможно. Кроме того, аммоний негативно влияет на каталитический центр кислород-выделяющего комплекса фотосистемы II [20].

**Мочевина.** Анализ кривой роста, полученной при культивировании *C. closterium* с использованием мочевины в качестве единственного источника азота, показал, что максимальная плотность культуры достигла своих расчётных величин, составив 3,2 г·л<sup>-1</sup> сухой биомассы (рис. 4). Наибольшая продуктивность зафиксирована на третьи сутки культивирования — 1,5 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Продуктивность культуры измеряли двумя методами — прямого взвешивания и йодатной окисляемости [2].

Доля азота в молекуле мочевины максимальна среди долей в молекулах источников азота и составляет 46,6 %. Одна молекула содержит два атома азота. Мочевина выступает источником не только азота, но и углерода; она включается во все основные циклы метаболизма диатомовых водорослей [28]. Вот почему при использовании мочевины в качестве единственного источника азота максимальная продуктивность культуры достигала 1,5 г·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>, при этом расход мочевины при получении 1 г сухой массы был вдвое меньше, чем расход нитрата натрия.

Диатомовая водоросль *C. closterium* способна поглощать и накапливать мочевину и при этом расти и вегетировать с высокими удельными скоростями, так как её клетки имеют два высокоаффинных транспортёра молекул мочевины — симпортёр JGI\_Pt\_20424, локализованный во внешней мембране, и симпортёр JGI\_39772, расположенный в мембране митохондрий [6]. Транспортёр мочевины с высоким сродством JGI\_Pt\_20424 содержит 15 трансмембранных доменов и филогенетически гомологичен транспортёру мочевины растений DUR3. Транспортёр мочевины JGI\_39772 переносит её молекулы в митохондрии, где мочевина может служить субстратом для уреазы. Этот транспортёр обеспечивает работу цикла мочевины [6]. Образовавшаяся мочевина регулирует другие



**Рис. 4.** Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* на питательной среде RS при использовании мочевины в качестве источника азота

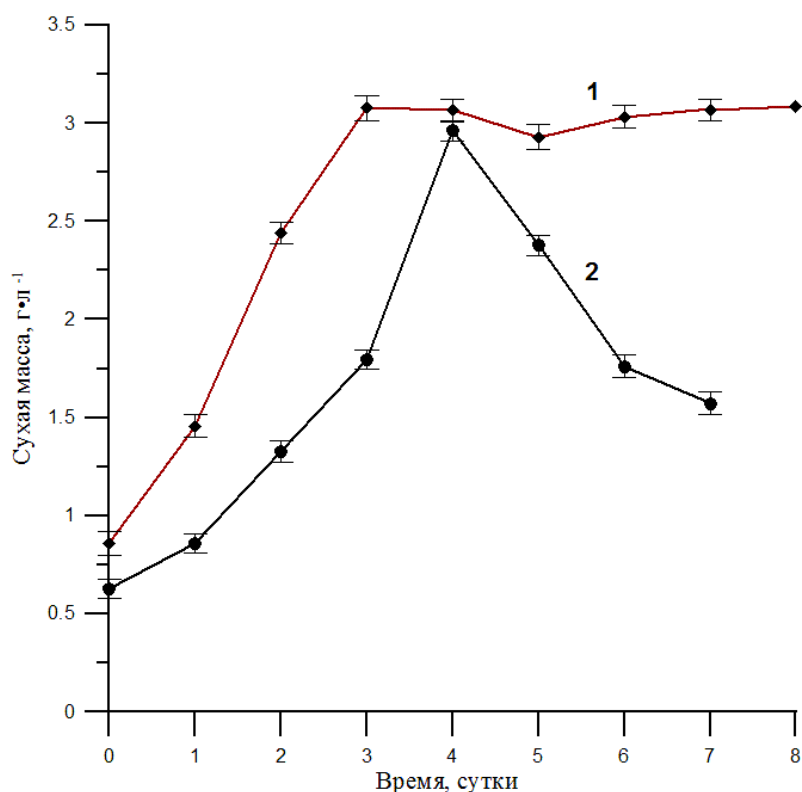
**Fig. 4.** The density dynamics of *C. closterium* in storage culture on RS nutrient medium when urea is used as a source of nitrogen

механизмы клеточного метаболизма, например катаболизм аминокислот, и служит осмолитом для клетки. Цикл мочевины соединён с циклами GS / GOGAT и трикарбоновых кислот за счёт аспартат-аргинино-сукцинатного шунта [23]. Можно сделать вывод, что ассимиляция мочевины не является лимитирующим звеном метаболизма *C. closterium*.

**Аминокислоты как источник азота.** Известно, что диатомовые водоросли способны поглощать и накапливать аминокислоты [13], однако потребление отдельных аминокислот видоспецифично. Глицин и гистидин преобладают у водорослей в стационарной фазе роста. Аланин и пролин превалируют при воздействии неблагоприятных факторов среды, когда в клетке происходят окислительные процессы [13]. Установлено, что клетки *C. closterium* не могут использовать аланин в качестве единственного источника азота. При выращивании *C. closterium* на питательной среде, где источником азота был аланин, клетки культуры погибали на второй-третий день. Известно, что аланин синтезируется у *C. closterium* в достаточном количестве для нормального метаболизма, но из околклеточной среды не поглощается [12]. В отличие от аланина, цистеин и аспарагин используются как субстрат для роста (рис. 5).

Аспарагин в диатомовых водорослях синтезируется из аспартата двумя способами: он использует в качестве донора аминогруппы либо глутамин, либо аммоний [12]. Ниже приведены данные по выращиванию *C. closterium* на питательной среде RS (N:P = 6:1) при применении в качестве источников азота двух аминокислот — цистеина и аспарагина (рис. 5). Биогенные элементы в питательных средах были рассчитаны на максимальную плотность культуры 3 г·л<sup>-1</sup> сухой массы. Максимальная плотность культуры при использовании цистеина и аспарагина достигла расчётных величин и составила 3,1 г·л<sup>-1</sup> сухой массы. Наибольшая продуктивность при добавлении цистеина и аспарагина — 0,9 и 1,3 г·л<sup>-1</sup> сухой массы в сутки соответственно.





**Рис. 5.** Динамика плотности накопительной культуры диатомовой водоросли *C. closterium* на питательной среде RS (N:P = 6:1) при использовании различных аминокислот в качестве источников азота: 1 — цистеин, 2 — аспарагин

**Fig. 5.** The density dynamics of *C. closterium* in storage mode of cultivation on RS nutrient medium (N:P = 6:1) using different amino acids as sources of nitrogen: 1 – cysteine, 2 – asparagine

При использовании цистеина в качестве единственного источника азота в питательной среде RS при отношении азота к фосфору 6:1 наблюдали продолжительную стационарную фазу, способствующую синтезу фукоксантина. При применении аспарагина стационарная фаза отсутствует. По-видимому, цистеин — углеводородный блок, который может непосредственно включаться в метаболизм, а также накапливаться в клетке как дополнительный источник азота [12]. Продуктивность *C. closterium* достигла своих максимальных значений ( $1,5 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ) при использовании мочевины, нитрата натрия и аспарагина (табл. 1).

**Таблица 1.** Максимальная продуктивность диатомовой водоросли *C. closterium* при культивировании на различных источниках азота

**Table 1.** Peak productivity of diatom *C. closterium* on various sources of nitrogen

Источники азота	Мочевина	Нитраты	Нитриты	Цистеин	Аспарагин
Максимальная продуктивность, $\text{г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$	$1,5 \pm 0,06$	$1,5 \pm 0,05$	$1 \pm 0,06$	$1 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,07$

Таким образом, при выращивании диатомовой водоросли *C. closterium* с целью обеспечения максимального выхода биомассы целесообразно использовать мочевины в качестве дополнительного источника азота, так как её расход при получении единицы биомассы в два раза меньше, чем расход других источников азота, и при этом продуктивность культуры достигает высоких значений —  $1,5 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ .

**Заключение.** Диатомовая водоросль *C. closterium* для своего роста и развития может использовать как неорганические, так и органические источники азота. Продуктивность микроводоросли достигает максимальных значений ( $1,5 \text{ г}_{\text{сух}} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ ) при добавлении мочевины, нитрата натрия и аспарагина. Установлено, что *C. closterium* способна расти и вегетировать при достаточно высоких концентрациях нитрита, а добавление азота в аммонийной форме в питательную среду во время активного роста микроводоросли приводит к ингибированию всех процессов метаболизма и к гибели культуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН ИМБИ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6) и при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00672.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Зозуля Ю. В., Уваров И. П., Репков А. П., Лелеков А. С. Промышленная технология производства биомассы морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin с использованием газовихревого фотобиореактора // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2016. № 1–1. С. 73–77. [Gevorgiz R. G., Zheleznova S. N., Zozulya Yu. V., Uvarov I. P., Repkov A. P., Lelekov A. S. Industrial production technology biomass marine diatoms *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin using gas vortex photobioreactor. *Aktual'nye voprosy biologicheskoi fiziki i khimii*, 2016, no. 1–1, pp. 73–77. (in Russ.)]
2. Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Никонова Л. Л., Бобко Н. И., Нехорошев М. В. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости. Севастополь, 2015. 31 с. (Препринт / РАН, Ин-т морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского). [Gevorgiz R. G., Zheleznova S. N., Nikonova L. L., Bobko N. I., Nekhoroshev M. V. *Estimation of microalgae culture density by iodate oxidation method*. Sevastopol, 2015, 31 p. (Preprint / RAS, Kovalevsky Institute of Marine Biological Research). (in Russ.)] <https://repository.marine-research.org/handle/299011/43>
3. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г., Нехорошев М. В., Бобко Н. И. Влияние концентрации азота в среде на накопление фукоксантина в биомассе диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* // *Морские биологические исследования: достижения и перспективы* : в 3-х т. : сб. материалов Всерос. науч.-практ. конф. с международным участием, приуроч. к 145-летию Севастопольской биологической станции, Севастополь, 19–24 сентября 2016 г. / под общ. ред. А. В. Гаевской. Севастополь : ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 1. С. 416–418. [Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G., Nekhoroshev M. V., Bobko N. I. Influence of nitrogen concentration on fucoxanthin accumulation in diatom *Cylindrotheca closterium* biomass. In: *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy* : v 3-kh t. : sb. materialov Vseros. nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem, priuroch. k 145-letiyu Sevastopol'skoi biologicheskoi stantsii, Sevastopol, 19–24 Sept., 2016 / A. V. Gaevskaya (Ed.). Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2016, vol. 1, pp. 416–418. (in Russ.)]
4. Рябушко В. И., Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г., Бобко Н. И., Лелеков А. С. Среда для интенсивного культивирования *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (Bacillariophyta) // *Альгология*. 2016. Т. 26, № 3. С. 237–247. [Ryabushko V. I., Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G., Bobko N. I., Lelekov A. S. The medium for intensive culture of the diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin (Bacillariophyta). *Al'gologiya*, 2016, vol. 26, no. 3, pp. 237–247. (in Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15407/alg26.03.237>
5. Allen A. E., Vardi A., Bowler C. An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, vol. 9, iss. 3, pp. 264–273. <http://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.013>
6. Allen A. E., Dupont C. L., Oborník M., Horák A., Nunes-Nesi A., McCrow J. P., Zheng H., Johnson D. A., Hu H., Fernie A. R., Bowler C. Evolution and metabolic significance of the urea cycle in photosynthetic diatoms. *Nature*, 2011, vol. 473, no. 7346,

- pp. 203–207. <http://doi.org/10.1038/nature10074>
7. Anderson M. A., Morel F. M. M. The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography*, 1982, vol. 27, iss. 5, pp. 789–813. <http://doi.org/10.4319/lo.1982.27.5.0789>
  8. Andersson M. G. I., van Rijswijk P., Middelburg J. J. Uptake of dissolved inorganic nitrogen, urea and amino acids in the Scheldt estuary: comparison of organic carbon and nitrogen uptake. *Aquatic Microbial Ecology*, 2006, vol. 44, iss. 3, pp. 303–315. <http://dx.doi.org/10.3354/ame044303>
  9. Berges J. Minireview: algal nitrate reductases. *European Journal of Phycology*, 1997, vol. 32, iss. 1, pp. 3–8. <https://doi.org/10.1080/09541449710001719315>
  10. Blasco D., Conway H. L. Effect of ammonium on the regulation of nitrate assimilation in natural phytoplankton populations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1982, vol. 61, iss. 2, pp. 157–168. [http://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90005-3](http://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90005-3)
  11. Bressler S. L., Ahmed S. I. Detection of glutamine synthetase activity in marine phytoplankton: Optimization of the biosynthetic assay. *Marine Ecology Progress Series*, 1984, vol. 14, pp. 207–217.
  12. Bromke M. A. Amino Acid Biosynthesis Pathways in Diatoms. *Metabolites*, 2013, vol. 3, iss. 2, pp. 294–311. <http://doi.org/10.3390/metabo3020294>
  13. Chen C., Li Q., Zhou Q., Sun L., Zheng M., Gao Y. Accumulation of free amino acids in marine diatom resting cells during rejuvenation. *Journal of Sea Research*, 2014, vol. 85, pp. 483–490. <http://doi.org/10.1016/j.seares.2013.08.003>
  14. de la Cuesta J. L., Manley S. L. Iodine assimilation by marine diatoms and other phytoplankton in nitrate-replete conditions. *Limnology and Oceanography*, 2009, vol. 54, iss. 5, pp. 1653–1664. <http://doi.org/10.4319/lo.2009.54.5.1653>
  15. Flynn K. J., Syrett P. J. Characteristics of the uptake system for L-lysine and L-arginine in *Phaeodactylum tricoratum*. *Marine Biology*, 1986, vol. 90, iss. 2, pp. 1151–1158. <http://doi.org/10.1007/BF00569121>
  16. Grant B. R., Madgwick J., Dal Pont G. Growth of *Cylindrotheca closterium* var. *californica* (Mereschk.) Reimann & Lewin on nitrate, ammonia, and urea. *Marine and Freshwater Research*, 1967, vol. 18, iss. 2, pp. 129–136. <http://doi.org/10.1071/MF9670129>
  17. Grant B. R., Turner I. M. Light-stimulated nitrate and nitrite assimilation in several species of algae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1969, vol. 29, iss. 3, pp. 995–1004. [http://doi.org/10.1016/0010-406X\(69\)91001-9](http://doi.org/10.1016/0010-406X(69)91001-9)
  18. Keeling P. J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 2010, vol. 365, no. 1541, pp. 729–748. <http://doi.org/10.1098/rstb.2009.0103>
  19. Milligan A. J., Harrison P. J. Effects of non-steady-state iron limitation on nitrogen assimilatory enzymes in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 2000, vol. 36, iss. 1, pp. 78–86. <http://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2000.99013.x>
  20. Parker M. S., Armbrust E. V. Synergistic effects of light, temperature and nitrogen source on transcription of genes for carbon and nitrogen metabolism in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 2005, vol. 41, iss. 6, pp. 1142–1153. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00139.x>
  21. Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Marine Drugs*, 2011, vol. 9, iss. 10, pp. 1806–1828. <http://doi.org/10.3390/md9101806>
  22. Price N. M., Harrison P. J. Uptake of urea C and urea N by the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Limnology and Oceanography*, 1988, vol. 33, iss. 4, pp. 528–537. <http://doi.org/10.4319/lo.1988.33.4.0528>
  23. Prihoda J., Tanaka A., de Paula W. B. M., Allen J. F., la Tirichine L., Bowler C. Chloroplast-mitochondria cross-talk in diatoms. *Journal of Experimental Botany*, 2012, vol. 63, iss. 4, pp. 1543–1557. <http://doi.org/10.1093/jxb/err441>
  24. Rogato A., Amato A., Iudicone D., Chiurazzi M., Ferrante M. I., d'Alcalà M. R. The diatom molecular toolkit to handle nitrogen uptake. *Marine Genomics*, 2015, vol. 24, pt. 1, pp. 95–108. <http://doi.org/10.1016/j.margen.2015.05.018>
  25. Song B., Ward B. B. Molecular cloning and characterization of high affinity nitrate transporters in marine phytoplankton. *Journal of Phycology*, 2007, vol. 43, iss. 3, pp. 542–552. <http://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00352.x>
  26. Suman K., Kiran T., Devi U. K., Sarma N. S. Culture medium optimization and lipid of *Cylindrotheca*, a lipid- and polyunsaturated fatty acid-rich pennate

- diatom and potential source of eicosapentaenoic acid. *Botanica Marina*, 2012, vol. 55, iss. 3, pp. 289–299. <http://doi.org/10.1515/bot-2011-0076>
27. Swamy U., Wang M., Tripathy J. N., Kim S. K., Hirasawa M., Knaff D. B., Allen J. P. Structure of spinach nitrite reductase: Implications for multi-electron reactions by the iron-sulfur:siroheme cofactor. *Biochemistry*, 2005, vol. 44, iss. 49, pp. 16054–16063. <http://doi.org/10.1021/bi050981y>
28. Williams S. K., Hodson R. C. Transport of urea at low concentrations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Bacteriology*, 1977, vol. 130, iss. 1, pp. 266–273.
29. Yuan L., Loqué D., Ye F., Frommer W. B., von Wirén N. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter *AtAMT1;1*. *Plant Physiology*, 2007, vol. 143, iss. 2, pp. 732–744. <http://doi.org/10.1104/pp.106.093237>

**PRODUCTION CHARACTERISTICS  
OF THE DIATOM *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN  
GROWN IN AN INTENSIVE CULTURE  
AT VARIOUS NITROGEN SOURCES IN THE MEDIUM**

**S. N. Zheleznova**

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: [zheleznovasveta@yandex.ru](mailto:zheleznovasveta@yandex.ru)

The diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Levin is characterized by high productivity (up to  $1.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ) and the ability to accumulate a valuable carotenoid fucoxanthin (up to 2 % of dry weight). In the development of biotechnology based on microalgae, the key issue is the creation of concentrated nutrient medium. Nitrogen is one of the most important components in the nutrient medium that significantly affects the production characteristics of all microalgae. The aim of this study is to compare the production characteristics of *C. closterium* in an intensive storage culture using different forms of nitrogen in the medium. In the first experiment, nitrate and sodium nitrite, urea, and nitrogen in the form of ammonium were used as a source of nitrogen. The amount of nitrates, nitrites, ammonium, and urea in the medium was calculated from the nitrogen content of the RS nutrient medium, with a nitrogen to phosphorus ratio of 15 : 1. In the second experiment, amino acids were used as a nitrogen source – arginine, asparagine, cysteine. The possibility of using the microalgae *C. closterium* for the growth of various organic sources of nitrogen (urea, cysteine, asparagine) was shown. Productive characteristics in the intensive storage culture of *C. closterium* using urea, cysteine, and asparagine as the sole source of nitrogen in the RS nutrient medium were determined. It is shown that when urea was used, the productivity reached its maximum values and amounted to  $1.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ . Thus, the expediency of using urea in the medium for obtaining the maximum yield of biomass was shown. The use of cysteine in the stationary phase of growth to achieve a long stationary phase with minimal concentrations of the nitrogen source in the nutrient medium is also advisable. It was found that *C. closterium* was able to grow and vegetate at sufficiently high concentrations of nitrite, and the addition of nitrogen in ammonium form to the nutrient medium during the active growth of *C. closterium* led to inhibition of all metabolic processes and to the death of the culture.

**Keywords:** diatom *Cylindrotheca closterium*, productivity, amino acids, urea, nitrogen, nitrates, nitrites, ammonium