

УДК 581.1

Л. Н. ЦОГЛИН¹, О. ПУЛЬЦ², Р. ШТОРАНДТ², А. Я. АКЫЕВ¹¹Ин-т физиологии растений РАН,
Россия, 127276 Москва, ул. Ботаническая, 35²Ин-т переработки зерна,
Германия, 14558 Бергольц-Рейбрюке, аллея Артура Шонерта, 40/41**ВЫБОР ПРОДУКТИВНЫХ ФОРМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ
МАССОВОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Выбор наиболее продуктивной формы *Chlorella vulgaris* Beijer. для массового культивирования в заданных климатических условиях осуществляли тремя методами: по параметрам синхронных культур, по ростовым кривым водорослей в накопительном режиме и автоселекцией. Культивирование проводили при стабильных (в лаборатории) среднестатистических условиях роста для региона Берлина, а также в естественных условиях на открытом воздухе. Использованы четыре штамма из разных коллекций: А-34, 211-11-в, С-1 и С-11. Культуры С-1 и А-34 имели примерно равные скорости роста, но выше, чем у культур С-11 и 211-11-в. Клеточный цикл и световая стадия развития клеток С-1 в заданных условиях были короче, что значительно повышало вероятность получения синхронизации при массовом культивировании. Кроме того, С-1 при выращивании на открытом воздухе оказалась гораздо устойчивее к неблагоприятным внешним воздействиям, чем остальные культуры. В процессе автоселекции как в лабораторных, так и в естественных условиях выделялась культура С-1. По-видимому, автоселекция является простым и надежным методом отбора наиболее продуктивной формы для заданных условий культивирования, но этот метод применим только тогда, когда химический состав производимой биомассы не имеет принципиального значения.

Ключевые слова: *Chlorella*, массовая культура, выбор форм, продуктивность, автоселекция.

Введение

При массовом культивировании микроводорослей с использованием солнечного освещения такие важные внешние параметры среды культивирования, как уровень солнечной радиации, длительность светового дня, дневные и ночные температуры, зависят от региона и не поддаются регулированию. Для повышения продуктивности установок большое значение имеет выбор штамма микроводоросли, обладающего наилучшими ростовыми характеристиками при существующих условиях культивирования, а также длительность лаг-периода культуры (который может проявляться в утренние часы), устойчивость к стрессовым факторам, к различным видам контаминации.

Учитывая естественный светопериодизм, наиболее удачным методом выращивания может оказаться синхронная культура. Как показали исследования на синхронных культурах (Nichei et al., 1954; Senger, 1971; Setlik et al., 1973; Цоглин, Клячко-Гурвич, 1980; Акыев, Цоглин, 1994), плато светового насыщения фотосинтеза и эффективность преобразования световой энергии клетками изменяются в ходе онтогенеза, значительно возрастая к середине цикла развития клетки и затем снова снижаясь к концу световой стадии. Это наилучшим образом совпадает с изменением солнечной активности в течение светового дня.

Процессы деления клеток и выхода автоспор в синхронной культуре, не требующие энергии света, могут при этом проходить в ночное время. Однако выращивание синхронной культуры в масштабах промышленных установок является трудно выполнимой задачей из-за непостоянства погодных условий, сезонного изменения длительности светового дня и высоких плотностей культуры. Тем не менее, получение хотя бы частичной синхронизации может значительно повысить продуктивность культуры.

© Л. Н. Цоглин, О. Пульц, Р. Шторандт, А. Я. Акыев, 1999

ISSN 0868-8540

Альгология. 1999. Т. 9. № 3

Algologia. 1999. V. 9. N 3

Для этого необходимо, чтобы культура, кроме перечисленных выше характеристик, имела длительность световой стадии развития, соответствующую средней за культивационный период длительности светового дня.

Нами была поставлена задача выбора наиболее продуктивного штамма *Chlorella* для массового культивирования на установках Ин-та переработки зерна в климатических условиях региона Берлина (Потсдам, Германия) (Pulz, 1992; Пульц, 1994).

Материалы и методы

Для работы отобраны следующие штаммы *Chlorella vulgaris* Beijer.: A-34 (коллекция Ин-та переработки зерна, Германия); 211-11-s (коллекция микроводорослей, Геттинген, Германия); IPPAS C-1 и IPPAS C-11 (коллекция Ин-та физиологии растений РАН).

Chlorella vulgaris A-34. Применяется для массового культивирования как форма, способная к высокоинтенсивному росту. Размер клеток от 3 до 10 мкм, оптимальная температура роста 35 °С, рН 7,0-8,5. Длительность клеточного цикла в оптимальных условиях не определялась. Клетки в зависимости от условий роста делятся на 2-32 автоспоры.

Chlorella vulgaris 211-11-s. Используется для массового культивирования. Мелкоклеточная форма с размерами клеток от 2 до 5 мкм. Оптимальная температура роста 35 °С, рН 7,0-8,0. Длительность клеточного цикла не изучалась. Клетки делятся на 2-16 автоспор.

Chlorella vulgaris C-1 (в более ранних публикациях известна как *Chlorella* sp. К.). Выделена в Архангельской обл. (Россия) в 1961 г. Размер клеток 2,2-4,5 мкм. Обладает высокой устойчивостью к стрессовым воздействиям. Диапазон допустимых значений рН от 4 до 9 в период роста клеток и от 6 до 9 в период их деления. Оптимальные условия культивирования: температура роста 36-38 °С, интенсивность света 800-2000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Клетки делятся на 2-32 автоспоры. Длительность клеточного цикла при температуре 36 °С составляет 10 ч, световой стадии развития – 6-7 ч. Длительность лаг-периода после неблагоприятных воздействий не превышает 4-5 ч.

Chlorella vulgaris C-11. Мутантная форма, полученная в 1961 г. в Лаборатории радиационной генетики АН СССР (Москва). Ранее имела название ЛАРГ-1. Размеры клеток от 4 до 16 мкм. Широкий диапазон оптимальных температур (28-35 °С) способствует массовому ее культивированию. Длительность цикла развития меньше зависит от температуры, чем у штамма C-1 и при 32 °С составляет 16 ч (световой период 10-12 ч). Клетки делятся преимущественно на 4-16 автоспор. Длительность лаг-периода может достигать 8-12 ч.

Культивирование проводили в плоских культивационных сосудах с толщиной слоя суспензии 4 см, соответствующей толщине слоя суспензии в установках закрытого типа Ин-та переработки зерна, в условиях, приближенных к среднестатистическим данным за летний культивационный период района Берлина, при температуре суспензии 26 °С, интенсивности света 250-300 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ и длительности светового дня 12 ч. Культуры барботировали газо-воздушной смесью с 2 %-м CO_2 со скоростью 2 л на 1 л суспензии в мин.

Оценку штаммов проводили тремя методами: по параметрам синхронной культуры, по кривым роста каждого из выбранных штаммов и по результатам автоселекции (Цоглин и др., 1967) в стабильных среднестатистических условиях в лаборатории и в естественных условиях на открытом воздухе.

Водоросли выращивали на разведенной в 2 раза среде Тамия следующего состава

ва (г/л): KNO_3 – 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,25; KH_2PO_4 – 0,625; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0045; EDTA – 0,0186; микроэлементы 0,5 мл/л.

Синхронизацию проводили по методике, описанной в литературе (Цоглин, Клячко-Гурвич, 1980). Каждый штамм, предварительно выращенный до плотности 1,0–1,5 г/л при интенсивности света $50 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, разбавляли до плотности 0,1–0,2 г/л и переводили на интенсивность света $250\text{--}300 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Затем следовали 2–3 цикла с чередованием света и темноты. Длительность светопериода подбирали для каждого из штаммов.

Измеряли следующие параметры: длительность полного цикла и световой стадии развития штаммов в заданных условиях культивирования, распределение клеток культур по размерам в ходе цикла развития, число образующихся автоспор (на приборе "Coulter Multisizer II", Coulter Electronics Ltd., England), рост сухой массы клеток ("MA-30" Sartorius, Германия), интенсивность света ("LI-189", LI-COR, USA), изменение оптической плотности при 750 нм ("Spekol 11", Carl Zeiss, Германия), pH среды ("pH-Metter 761 Calimatic", Knick, Германия) и концентрацию растворенного кислорода (pO_2 , "Oxi 92", Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Германия).

Результаты и обсуждение

Изучение характеристик штаммов с помощью синхронных культур.

На рис. 1 показано распределение клеток по размерам в синхронных культурах С-1 (рис. 1, а) и А-34 (рис. 1, б) в ходе клеточного цикла. С увеличением времени выращивания синхронной культуры амплитуда пиков числа клеток постепенно снижалась, а ширина возрастала, что связано с увеличивающимся разбросом в объемах клеток в процессе развития популяции. Значения среднего диаметра автоспор несколько изменялось после каждого цикла (кривые распределения для 0 ч и 12,5 ч у культуры А-34 и 0 ч и 10 ч у культуры С-1). Колебания среднего размера автоспор А-34 в разных циклах составляли 0,8 мкм (от 3,2 до 4,0 мкм), у культуры С-1 – 0,4 мкм (2,5–2,9 мкм). Особенно сильное расширение пиков наблюдалось в конце клеточного цикла, что связано с делением клеток на разное число автоспор. Средний диаметр делющихся клеток А-34 был равен 7,7 мкм, С-1 – 4,3 мкм.

Измерения скоростей прироста биомассы и выделения кислорода (рис. 2, а, б) показали, что эти процессы имеют четко выраженные максимумы в середине световой стадии развития, свидетельствующие о более высокой фотосинтетической активно-

Характеристики штаммов *Chlorella vulgaris* Beijer.

Признак	Штамм			
	С-1	А-34	211-11-s	С-11
Диаметр автоспор, мкм	2,5–2,9	3,2–4,0	2,0–2,7	4,0–4,2
Число автоспор, ед.	4–8	4–16	4–8	4–8
Длительность клеточного цикла, ч	16	17	20	20
Длительность светового периода, ч	9–10	11–12	14–15	13
Прирост биомассы клетки за цикл	в 6,2 раза	в 4,4 раза	в 3,9 раза	в 4,2 раза
Условия культивирования: интенсивность света – $250 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, температура суспензии – 26°C .				

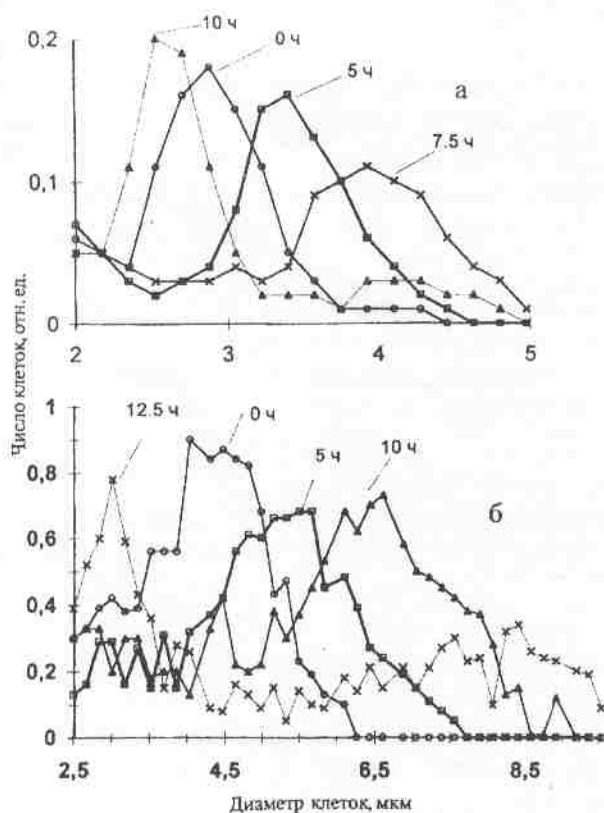


Рис. 1. Изменение распределения клеток по размерам в ходе клеточного цикла синхронных культур *Chlorella vulgaris* Beijer. C-1 (а) и *Chlorella vulgaris* A-34 (б). Цифры над кривыми обозначают время начала клеточного цикла.

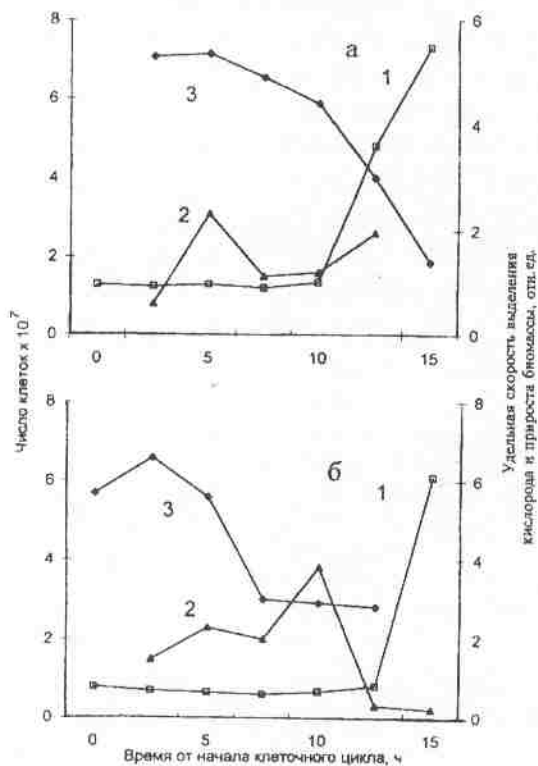


Рис. 2. Динамика изменения числа клеток (1), удельной скорости выделения кислорода (2) и удельной скорости прироста биомассы (3) в ходе клеточного цикла синхронных культур *Chlorella vulgaris* Beijer. C-1 (а) и *Chlorella vulgaris* A-34 (б).

сти клеток в эти периоды развития. Максимумы скоростей выделения кислорода приходились на более ранние стадии развития клеток, чем максимумы скоростей прироста биомассы.

Аналогично, с помощью синхронных культур были получены характеристики штаммов *Chlorella* C-11 и 211-11-S, представленные в таблице, из которой видно, что для культивирования при средней длительности светового дня 12 ч подходят штаммы *Chlorella* C-1 и A-34, имеющие продолжительность световых периодов соответственно 10 и 12 ч. Штамм C-1 при более короткой световой стадии развития в заданных условиях культивирования давал больший прирост биомассы за световой день, чем штамм A-34.

Таким образом, изучение характеристик штаммов с помощью синхронных культур в стабильных температурных и световых условиях (в лаборатории) показало, что наиболее продуктивным при массовом культивировании в районе Берлина будет штамм C-1.

Кривые роста штаммов в естественных условиях (на открытом воздухе) и в стабильных условиях (в лаборатории). Кривые роста культур в стабильных условиях снимались при тех же значениях внешних параметров, что и для синхронной культуры.

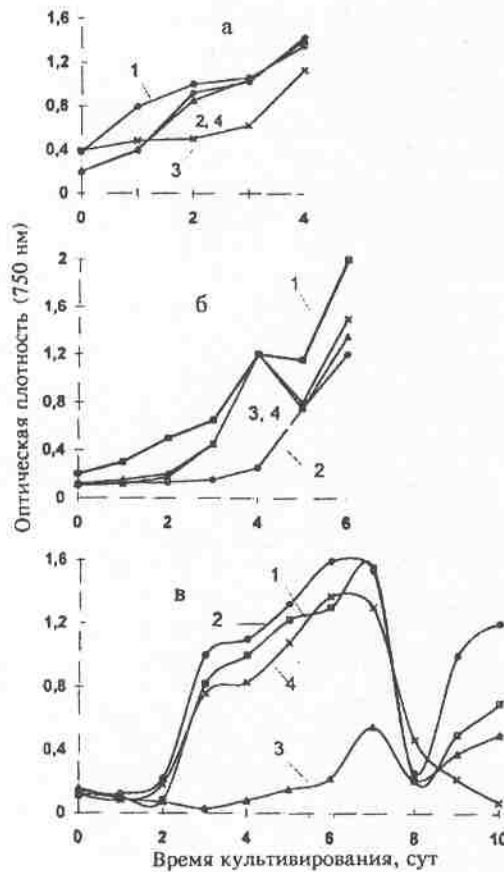


Рис. 3. Ростовые кривые культур *Chlorella vulgaris* Beijer.: C-1 (1), A-34 (2), C-11 (3) и 211-11-s (4) в заданных стабильных условиях культивирования (а): интенсивность света $250-300 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, длительность светового дня 12 ч, температура суспензии 26°C ; в условиях открытого воздуха при низких дневных температурах, облачности (б) и при экстремально высоких дневных температурах (в). Стрелкой (а) отмечен момент разведения культур.

Для выращивания на открытом воздухе использованы культуральные сосуды с относительно невысокой начальной плотностью засева (0,2-0,4 единицы оптической плотности (D_{750})).

Из рис. 3 видно, что скорости роста культур в лабораторных (рис. 3, а) и естественных условиях (рис. 3, б, в) существенно не различались, но в естественных условиях выращивания у культур А-34, С-11 и 211-11-с наблюдался длительный лаг-период (порядка 2 сут).

Культивирование штаммов в естественных условиях проводили дважды, причем погодные условия в обоих случаях значительно отличались от среднестатистических. В первом случае (рис. 3, б) температура воздуха днем составляла 14-19 °С, а температура суспензии в культуральных сосудах не превышала 22 °С. Интенсивность солнечной радиации из-за облачности колебалась от 150 до 1200 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. В этих условиях штамм С-1, также как и в стабильных, имел некоторые преимущества по сравнению с другими формами, а штамм А-34 первые 3 дня практически не рос.

Во втором случае (рис. 3, в), наоборот, выращивание культур проходило при температуре воздуха в дневное время 30-35 °С, а в ночные часы - до 10-12 °С. При этом температура суспензии с 12 до 16 ч поднималась до 42 °С. Интенсивность солнечной радиации в середине дня составляла 1000-1500 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ при среднем значении за световой период 450-500 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. В этих условиях рост культур штаммов А-34, С-1 и С-11 был примерно одинаковым (наибольшая скорость роста была у штамма А-34), а штамм 211-11-с существенно отставал в росте, по-видимому, из-за высокой освещенности и температуры. После разведения культур также проявились преимущества штамма А-34 в этих условиях.

Как видно из представленных данных, по кривым роста не удалось достаточно четко определить преимущества той или иной культуры, но они показали значительно более высокую устойчивость штамма С-1 к действию неблагоприятных факторов.

Процессы автоселекции в смешанной популяции. Возможность применения метода автоселекции для выбора наиболее продуктивной формы на заданные параметры культивирования в лабораторных условиях была показана ранее (Цоглин и др., 1967; Цоглин и др., 1970).

На открытом воздухе метод автоселекции не применялся. В данной работе мы попытались использовать этот метод для отбора наиболее продуктивного штамма как на открытом воздухе, так и при стабильных параметрах культивирования в лаборатории.

Поскольку визуально под микроскопом определить принадлежность клетки к тому или иному штамму практически невозможно, для определения выделившегося в результате автоселекции штамма в конце эксперимента в смешанной культуре определяли распределение клеток по размерам и сравнивали его с распределением клеток по размерам для монокультуры каждой формы.

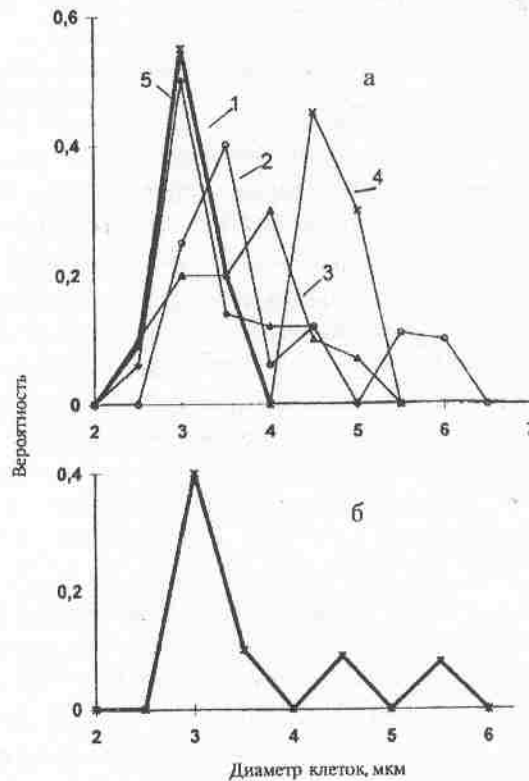
Плотность засева каждого штамма в смешанной культуре составляла примерно 0,05 единиц оптической плотности (D_{750}). Процесс длился 5 дней в стабильных лабораторных условиях и 12 дней на открытом воздухе. После достижения смешанной культурой плотности 2,5 г/л ее разбавляли свежей питательной средой, затем разбавления проводили ежедневно в ночное время до концентрации биомассы в суспензии порядка 1,0 г/л.

После 12 дней выращивания смешанной культуры на открытом воздухе в условиях массового культивирования распределение клеток по размерам (рис. 4, а) находилось в диапазоне 2-4 мкм и почти полностью совпадало с пиком автоспор и молодых клеток штамма С-1. Это свидетельствует о значительном преобладании клеток этого

штамма в популяции и о том, что в результате естественного светопериодизма произошла синхронизация культуры. Пик автоспор А-34 расположен близко к пику смешанной культуры, что не исключает присутствия некоторого количества клеток этого штамма в смешанной культуре.

За 5 дней автоселекции в стабильных условиях культивирования не произошло такого четкого выделения культуры С-1 (рис. 4, б) и степень синхронизации оказалась ниже, чем после 12 дней культивирования на открытом воздухе. Основной пик равномерного распределения смешанной культуры также соответствовал автоспорам и молодым клеткам штамма С-1, но присутствовали пики делящихся клеток этой культуры (4,5 мкм) и пик более крупных клеток (5,5 мкм), характерный для клеток штамма А-34 на середине световой стадии развития.

Рис. 4. Распределение клеток по размерам в монокультурах *Chlorella vulgaris* Beijer.: С-1 (1), А-34 (2), С-11 (3) и 211-11-с (4) и в смешанной культуре (5) после 12 дней выращивания на открытом воздухе (а) и 5 дней выращивания в стабильных лабораторных условиях (б).



Таким образом, проведенные исследования показали, что из выбранных для экспериментов культур *Chlorella* штаммы С-1 и А-34 имеют лучшие ростовые характеристики в заданных условиях по сравнению со штаммами С-11 и 211-11-с. Длительности световых стадий развития этих культур (10 ч у штамма С-1 и 12 ч у А-34) позволяют, по-видимому, получить хотя бы частичную синхронизацию в условиях массового культивирования. Однако необходимо учитывать, что время пребывания клеток на свету обычно меньше длительности светового дня, поскольку клетки периодически попадают в темновые емкости установки (сборники суспензии, насосы, трубопроводы). Время пребывания клеток на свету уменьшается пропорционально отношению светового и темнового объемов суспензии в установке. Так, например, для установки Ин-та переработки зерна с общим объемом суспензии 6000 л (рис. 5, Pulz, 1992), имеющей темновой объем порядка 600-800 л, время пребывания клеток на свету уменьшается на 10-15 % и применение штамма С-1 даст большую вероятность пол-

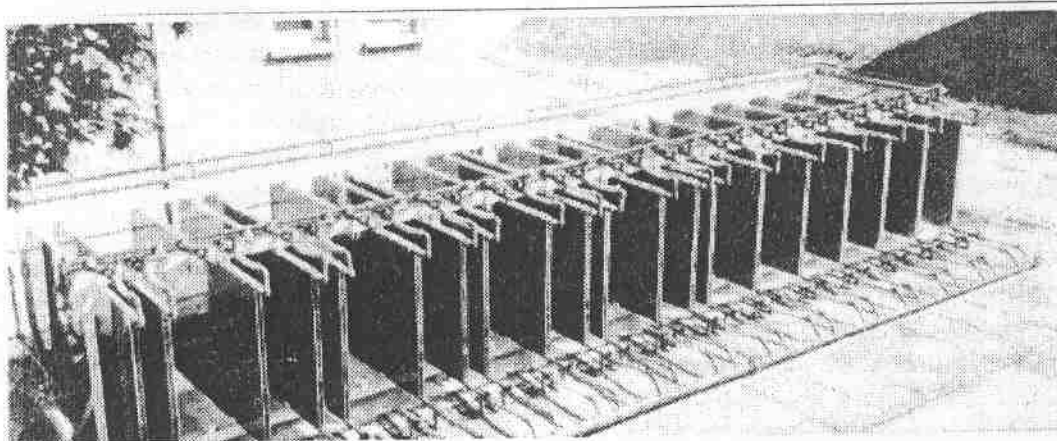


Рис. 5. Общий вид установки для массового культивирования микроводорослей объемом 6000 л Ин-та переработки зерна (Потсдам, Германия).

учения синхронной культуры. Это хорошо видно из рис. 4, а, где показано, что после 12 дней культивирования смешанной культуры произошло не только выделение штамма С-1, но и его достаточно хорошая синхронизация.

Параметры синхронной культуры в среднестатистических условиях роста несут много информации для выбора наиболее продуктивной формы, но этот метод связан со значительными трудностями процесса синхронизации и не позволяет установить степень устойчивости культур к неблагоприятным воздействиям. Эти качества культур хорошо проявились при их выращивании на открытом воздухе в неблагоприятных погодных условиях. При низкой температуре и частых резких изменениях интенсивности солнечной радиации (см. рис. 3, б) штамм А-34 имел длительный период адаптации, культура аглютинировала и оседала на дно и стенки культуральных сосудов. При высоких температурах (см. рис. 3, в) наблюдалась значительная задержка роста штамма 211-11-с.

Проведенные исследования показали, что культура С-1 при близких с А-34 ростовых характеристиках обладает значительно более высокой степенью устойчивости к неблагоприятным воздействиям и способна к росту в широком диапазоне температур и интенсивности света. В результате автоселекции как в реальных, так и стабильных лабораторных условиях произошло выделение формы С-1. По-видимому, метод автоселекции является наиболее простым и надежным способом выбора форм по продуктивности для массового культивирования.

При выборе форм по ростовым характеристикам или методом автоселекции учитывается лишь одно качество культур – скорость размножения клеток в заданных условиях роста, и такой отбор можно проводить лишь в тех случаях, когда главное внимание уделяется получению биомассы, а ее состав, который в определенных пределах зависит от культивируемого штамма, не имеет принципиального значения. Этот метод можно использовать для быстрого скрининга форм (например, при очистке промышленных стоков с использованием микроводорослей).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-49165) и Министерства науки, исследований и культуры Земли Бранденбург (Германия, грант № П.6-3502-1/65).

L.N. Tsoglin¹, O. Pulz², R. Störandt², A.Y. Aktyev¹

¹Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
35, Botanicheskaya St., Moscow, 127276, Russia

²IGV Institute of Cereal Processing,
40/41, Arthur-Scheunert-Allee, Bergholz-Rehbrücke, 14558, Germany

THE SELECTION OF PRODUCTIVE FORMS OF MICROALGAE FOR MASS CULTIVATION

The selection of high productive strain of *Chlorella vulgaris* for mass culture was carried out. The several strains were performed according to three methods: parameters of synchronous cultures, growth curves, and method of autoselection. Cultivation was performed under stable average statistical growth conditions of the region of Berlin (in laboratory) as well as under real open-air conditions. Four strains from various strain collections were used: A-34, 211-11-s, C-1, C-11. The strains C-1 and A-34 had nearly the same growth rates, higher than those of the strains C-11 and 211-22-s. The cell cycle and the light phase of cell development at the given conditions were shorter for C-1, favouring the probability to achieve synchronization during mass cultivation. In open-air conditions, C-1 proved to be more resistant to adverse effects than the other strains. During autoselection under stable as well as under real conditions, strain C-1 was evident. Autoselection obviously is a simple and reliable method to select the most productive strain for the given cultivation conditions. This method, however, is applicable only if the chemical composition of biomass is of secondary importance.

Key words: *Chlorella*, mass culture, productive strain, biomass, autoselection.

- Актыев А. Я., Цоглин Л. Н. O₂-газообмен и накопление биомассы в клеточном цикле *Chlorella* IPPAS C-1 в зависимости от содержания O₂ в культуральной среде // Физиол. раст. – 1994. – 41, № 2. – С. 203-208.
- Пульц О. Плоскостной биореактор закрытого типа для продукции биомассы микроводорослей // Там же. – С. 163-169.
- Цоглин Л. Н., Семенов В. Е., Поляков А. К. Теоретическое обоснование принципа автоматического конкурсного отбора продуктивных форм одноклеточных водорослей на основе математического моделирования динамики роста многокомпонентной популяции в проточном режиме // Биофизика. – 1967. – 12, № 4. – С. 704-714.
- Цоглин Л. Н., Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Математическое и экспериментальное моделирование процесса автоселекции микроводорослей в условиях проточного культивирования // Физиол. раст. – 1970. – 17, № 6. – С. 1129-1139.
- Цоглин Л. Н., Клячко-Гурвич Г. Л. Изменения функциональной активности хлоропласта в клеточном цикле хлореллы // Там же. – 1980. – 27, № 6. – С. 1172-1179.
- Nichei T., Sasa T., Miyachi S., Suzuki K., Tamiya H. Change of photosynthetic activity of *Chlorella* cell during the course of their life cycle // Arch. Mikrobiol. – 1954. – 21, N 1. – P. 155-167.
- Pulz O. Cultivation techniques for microalgae in open and closed systems // Proc. 1-st Europ. Workshop on Microalgal Biotechnology. – Potsdam; Rehbrücke, 1992. – P. 61-67.
- Senger H. Quantum yield of photosynthesis in synchronous cultures of algae // I Europ. Biophys. Congr. - Baden; Vienna, 1971. – P. 33-39.
- Setlik I., Ried A., Berkova E., Bossert U. The effect of low irradiances on oxygen exchange in green and blue-green algae. 2. Variation in efficiency of steady-state oxygen exchange rates during the cell cycle *Scenedesmus quadricauda* // Photosynthetica. – 1973. – 7, N 1. – P. 177-186.

Получена 13.07.98

Подписала в печать Е. И. Шнюкова