

Общ.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

# УПРАВЛЯЕМЫЙ БИОСИНТЕЗ



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА» МОСКВА 1966

**СБАЛАНСИРОВАННЫЕ СРЕДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ  
ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ УСЛОВИЙ  
МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ  
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ИНТЕНСИВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ**

Е. Д. КУЗНЕЦОВ, В. Е. СЕМЕНЕНКО

В связи с возможным использованием одноклеточных водорослей для пищевых, кормовых и промышленных целей и особенно в качестве автотрофного звена замкнутых экологических систем при полетах человека в космос возникает необходимость разработки способов стабилизации условий роста и фотосинтеза этих организмов при их длительном интенсивном культивировании [1—3]. В настоящее время предложены эффективные способы стабилизации таких важных факторов роста и фотосинтеза водорослей, как свет, температура, концентрация  $\text{CO}_2$  и интенсивность перемешивания культуры [3, 4]. Однако до сих пор наименее разработанным остается вопрос о стабилизации условий минерального питания водорослей.

Среди предложенных методов стабилизации условий минерального питания водорослей значительный интерес представляет принцип сбалансированных сред. Под сбалансированными средами понимаются такие питательные растворы, которые по соотношению элементов копируют вынос минеральных веществ с урожаем биомассы [5, 6].

Несбалансированные среды, пока еще широко применяемые при массовом культивировании водорослей, обладают рядом недостатков, которые сильно затрудняют стабилизацию условий минерального питания. Примером несбалансированной среды может служить среда Тамия с нитратным азотом, содержащая значительный избыток калия [5, 7]. Рост хлореллы на этой среде сопровождается увеличением ее щелочных свойств, в частности значительным повышением рН питательного раствора и накоплением в нем карбонатных и бикарбонатных ионов [7, 8]. Повышение щелочных свойств питательного раствора приводит к выпадению в осадок магния и фосфора, вследствие чего их вынос из среды по ходу роста хлореллы выражается S-образной кривой, не связанной с кривой роста культуры. В то же время азот, сера и калий равномерно выносятся из этой среды в соответствии с характером роста водорослей [7, 8]. Рост водорослей на среде Тамия с нитратным азотом приводит к значительному изменению первоначального соотношения ионов [7], к недостатку одних элементов и к избыточному накоплению других. Последнее

особенно заметно в том случае, если после снятия определенного урожая биомассы водорослей периодически добавлять в питательный раствор полную норму солей среды Тамия [9].

Разбаланс ионов, наступающий при длительном интенсивном культивировании хлореллы на среде Тамия с добавлением солей, может приводить к значительному угнетению роста водорослей. При этом рост хлореллы тормозится, по-видимому, вследствие одновременного действия избытка ионов калия и избытка гидроксильных ионов. Интересно отметить, что после нейтрализации среды кислотой избыток калия уже не оказывает угнетающего действия [9]. Помимо возможного угнетающего действия на рост водорослей избытка или недостатка отдельных ионов отрицательной стороной несбалансированных сред является выпадение в осадок фосфора и магния, что затрудняет стабилизацию питательного раствора.

Главная причина дисбаланса среды Тамия с нитратным азотом заключается в избытке ионов калия, вводимого в виде соли  $KNO_3$ . Чтобы устранить эту причину, Тамия с сотр. [5] модифицировал свою среду, введя в нее в качестве источника азота вместо  $KNO_3$  мочевины. Эта замена привела к тому, что среда стала более сбалансированной и рост водорослей на ней уже не сопровождался сколь-либо существенным изменением pH. Однако среда Тамия с мочевиной не является сбалансированной средой в полном смысле этого слова, так как она более или менее уравновешена по соотношению катионов и анионов, но не уравновешена по соотношению элементов. Сравнение этой среды с составом биомассы хлореллы показывает, что она сильно несбалансирована по содержанию серы и магния. Относительное содержание этих элементов в среде более чем в три раза выше, чем в биомассе. Учитывая это обстоятельство, мы изменили в среде содержание соли  $MgSO_4$  и составили ряд питательных растворов, которые по соотношению элементов были значительно ближе к сбалансированной среде в строгом значении этого термина.

В табл. 1 представлен состав одного из лучших вариантов сбалансированной среды в сравнении с составом сред Тамия и с выносом элементов биомассой хлореллы. Из табл. 1 видно, что предложенная нами сбалансированная среда № 3 по соотношению элементов близка к составу биомассы. Как показали опыты, среда № 3 способна обеспечивать столь же интенсивный рост водорослей, как и среды Тамия, и причем без существенных изменений pH питательного раствора (табл. 2).

Как для среды Тамия с мочевиной, так и для сбалансированной среды № 3 было установлено, что потребление хлореллой макроэлементов в значительных пределах не зависит от их концентрации в среде (рис. 1). Это обстоятельство указывает на то, что при выращивании водорослей непосредственно на сбалансированных средах исходное соотношение элементов должно

Таблица 1

Состав питательных сред в сравнении с выносом макроэлементов биомассой водорослей *Chlorella* sp. K.

Состав питательных сред, г/л	Анализируемый материал	Элемент				
		азот	фосфор	сера	калий	магний
Среда Тамия с нитратным азотом KNO <sub>3</sub> —5,0; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O—2,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> —1,25	I	100	41	46	328	35
	II	100	29	436	3132	83
	III	100	39	6,6	49	36
Среда Тамия с мочевиной (мочевина—3,0; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O—2,5; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> —1,25)	I	100	20	23	25	17,5
	II	100	20	39	34	27
	III	100	21	6,8	18	5,6
Сбалансированная среда № 3 (мочевина—3,0; MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O—0,75; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> —1,5)	I	100	24	7,0	31	5,3
	II	100	25	10,8	42	6,2
	III	100	18	5,9	19	5,5

Примечание. I—исходный состав среды, II—состав среды после прироста 7,5 г сухого вещества водорослей на 1 л питательного раствора, III—вынос элементов на единицу биомассы водорослей. Содержание и вынос элементов даны в процентах к содержанию и выносу азота.

Таблица 2

Сравнительная характеристика роста водорослей *Chlorella* sp. K. на средах Тамия и на сбалансированной среде № 3

День культивирования	Среда Тамия с нитратным азотом		Среда Тамия с мочевиной		Сбалансированная среда № 3	
	число клеток, млн/мл	pH среды	число клеток, млн/мл	pH среды	число клеток, млн/мл	pH среды
0	6,1	5,60	6,1	5,40	6,1	5,42
1	142	6,80	146	5,64	144	5,61
3	365	7,65	385	5,85	385	5,78
5	570	8,00	590	6,02	585	5,98
7	740	8,50	780	6,27	780	6,02
9	940	8,44	980	6,17	970	6,10

сохраняться в широких интервалах падения концентраций, связанного с ростом биомассы водорослей. При этом все макроэлементы среды исчерпываются более или менее одновременно. Восстановление первоначального состава сбалансированной среды по методу Краусса [8, 10] значительно облегчается тем, что в культуральную среду добавляется тот же раствор, но более концен-

трированный, либо набор солей, взятых в том же соотношении. Иными словами, в качестве как культурального, так и стабилизирующего растворов может быть использована одна и та же сбалансированная среда, но разной концентрации.

Сбалансированные среды могут применяться как стабилизирующие растворы при проточном культивировании водорослей

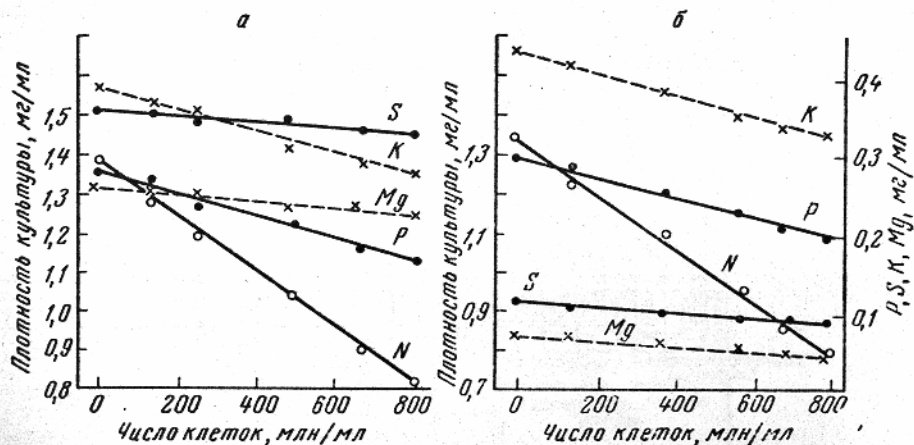


Рис. 1. Зависимость содержания макроэлементов в питательном растворе от количества приросших клеток водорослей *Chlorella* sp. К.

а — среда Тамия с мочевиной; б — сбалансированная среда № 3

с возвратом среды. В этом случае восстановление питающей среды (т. е. среды, подаваемой в реактор) осуществляется посредством добавления к фоновой среде (среде, выходящей из реактора) определенной порции стабилизирующего раствора, содержащего минеральные элементы в том же соотношении, что и в урожае биомассы водорослей.

Рассмотрим усложненный, но практически вполне вероятный вариант применения сбалансированных сред для стабилизации питающей среды в изменяющихся условиях культивирования водорослей. Состав стабилизирующего раствора, естественно, не может быть во всех случаях один и тот же. Разные конструктивные изменения реактора, изменение параметров культивирования, введение в культуру новых штаммов водорослей и т. д. — все это так или иначе будет изменять сопряженный с метаболизмом клеток биологический вынос элементов из среды, вызывая необходимость корректировки стабилизирующего раствора. Поскольку имеется бесконечное множество направлений, по которым может меняться вынос элементов, то, по-видимому, для регулирования состава стабилизирующего раствора рационально использовать специальное электронное устройство и систему кор-

ректирующих растворов. Под системой корректирующих растворов понимается набор растворов отдельных элементов (в виде соответствующих кислот или оснований) вместе с дозаторами этих растворов (рис. 2). Из реактора периодически сливаются определенные порции суспензии, которые разделяются центрифугированием на биомассу и фоновую среду. Далее фоновая

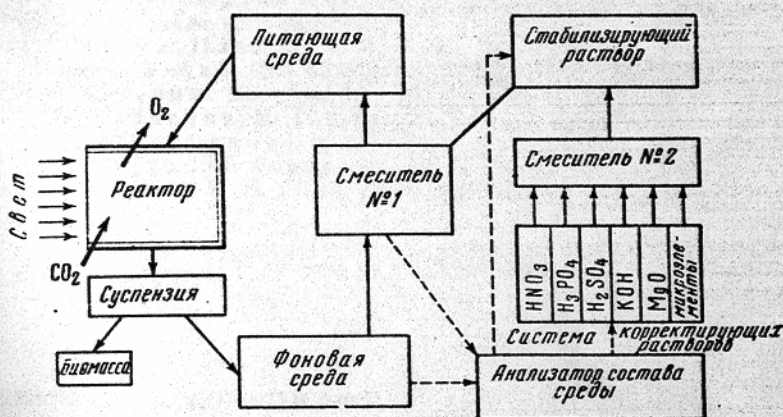


Рис. 2. Принципиальная схема системы стабилизации условий минерального питания одноклеточных водорослей при их непрерывном проточном культивировании с возвратом среды и регулированием состава стабилизирующего раствора

среда поступает в смеситель № 1, куда под контролем анализатора состава среды добавляется стабилизирующий раствор до тех пор, пока смесь по содержанию элементов не восстановится до уровня питающей среды. Затем эту смесь подают в бак с питающей средой. Особая роль отводится системе корректирующих растворов. Если вынос элементов биомассой не меняется, то корректирующие растворы служат лишь источниками элементов, из которых периодически составляются определенные порции стабилизирующего раствора взамен израсходованного. Если же вынос каких-то элементов из среды изменяется, то корректирующие растворы, на основании сигналов, поступивших от анализатора состава среды, составляют стабилизирующий раствор уже по другой программе, с учетом изменений, произошедших при этом в фоновой среде.

Таковы в общих чертах возможности применения сбалансированных сред для стабилизации условий минерального питания водорослей при их длительном интенсивном культивировании.

В заключение приносим искреннюю благодарность проф. А. А. Ничипоровичу за постоянный интерес и внимание к рассматриваемому вопросу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. А. Ничипорович. 1961. О производственной культуре одноклеточных водорослей. М., изд-во «Знание».
2. А. А. Ничипорович. 1963. В сб.: Космос. М., Изд-во АН СССР.
3. Управляемое культивирование микроводорослей. 1964. М., изд-во «Наука».
4. В. Е. Семенов, М. Г. Владимирова, Л. Н. Цоглин, М. И. Таутс, Ю. Н. Филипповский, Г. Л. Клячко-Гурвич, Е. Д. Кузнецов, Л. С. Кованова, Н. И. Райков. 1965. В сб.: Управляемый биосинтез и биофизика популяций. Тезисы докладов. Красноярск; см. также настоящий сборник.
5. H. Tamiya, Hase E., Schibata K., Mituya A., Iwamura T., Nihei T., Sasa T. 1953. Carnegie Inst. Wash. Publ., 600, 204.
6. В. Н. Кетчум. 1954. Ann. Rev. Plant Physiol., 5, 55.
7. Е. Д. Кузнецов, М. Г. Владимирова. 1965. Физиол. раст., 12, 33.
8. М. Г. Владимирова, Е. Д. Кузнецов. 1964. Физиол. раст., 11, 827.
9. М. И. Таутс. 1965. Физиол. раст., 11, 247.
10. R. W. Krauss, W. H. Thomas. 1954. Plant Physiol., 29, 205.

### ИЗМЕНЕНИЯ В СКОРОСТИ РОСТА И ХИМИЧЕСКОМ СОСТАВЕ МИКРОВОДОРОСЛИ ХЛОРЕЛЛА, ВЫЗВАННЫЕ ЛИМИТИРОВАНИЕМ БИОСИНТЕЗА БИОГЕННЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ

И. И. ГИТЕЛЬЗОН, Г. И. САДИКОВА,  
Л. Н. БОРОДКИНА, М. И. БАЗАНОВА

В настоящей работе излагаются результаты исследований изменений биохимического и атомарного состава клеток *Chlorella vulgaris*, возникающих в результате остаточного биосинтеза при отсутствии одного из основных биогенных элементов (N, P, S, K, Mg) в питающей среде и высоком уровне остальных параметров биосинтеза.

Опыты по изменению биохимического состава клеток *Chlorella vulgaris* штамма Института микробиологии АН УССР проводились при непрерывном культивировании при стабильных физических параметрах (освещенность  $290 \cdot 10^3 \pm 5 \cdot 10^3$  эрг/см<sup>2</sup> · сек; температура  $37^\circ \pm 1^\circ$ ; барботаж воздуха 5,5 л/мин; углекислота 5%; концентрация биомассы от 11 до 18 г/л в разных опытах). Использовалась лабораторная установка, описание которой имеется в статье Коврова и Буданова [1].

Исследованию влияния каждого биогенного элемента предшествовал фоновый этап, во время которого хлорелла культивировалась на полной питательной среде при тех же условиях.