

УДК 581.19

С. С. МЕЛЬНИКОВ, Е. Е. МАНАНКИНА, Т. В. САМОВИЧ, Н. В. КОЗЕЛ, Н. В. ШАЛЬГО

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ ХЛОРЕЛЛЫ

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, e-mail: kmi@tut.by*

*(Поступила в редакцию 19.12.2013)*

**Введение.** Известно, что целый ряд водорослей представляет особую научную и хозяйственную ценность. К таким водорослям относится хлорелла, которая на протяжении многих лет служит объектом промышленной биотехнологии. Ее биомасса содержит более 350 индивидуальных соединений, многие из которых являются биологически активными – это витамины, аминокислоты, фенольные соединения, цитокинины, ауксины, стерины, полиненасыщенные жирные кислоты [1]. Среди этих веществ есть также соединения, обладающие бактерицидной активностью, что позволяет при использовании хлореллы в качестве кормовой добавки для животных снизить использование ветеринарных препаратов [2]. Хлореллу весьма успешно применяют в сельскохозяйственном производстве (скотоводстве, свиноводстве, звероводстве, птицеводстве) в качестве кормовой добавки, показана высокая эффективность хлореллы и ее культуральной среды для улучшения плодородия почв, увеличения всхожести семян, а также при силосовании [1, 3–7].

Биотехнологическое производство хлореллы, а также ее культивирование в лабораториях происходит в искусственно созданных условиях на растворах солей с освещением от электрических источников света, что связано с большими затратами на освещение и приготовление питательных сред.

Поэтому основным путем снижения указанных выше затрат на производство хлореллы является оптимизация питательных сред и источников фотосинтетически активного света. Следует отметить, что питательные среды, широко используемые в настоящее время для культивирования водорослей, дорогостоящие. В частности, среда Тамия [8], активно применяемая для выращивания хлореллы, содержит больше питательных веществ, чем необходимо для нормального протекания фотобиосинтеза, что делает ее использование при промышленном производстве водоросли весьма не рациональным.

Снижение затрат на электроэнергию можно достичь либо модификацией источников света, либо подбором оптимального для хлореллы фотопериода. Работы по оптимизации источников фотосинтетически активного света для выращивания водорослей проводятся в настоящее время весьма активно, в том числе и в Беларуси [9], в то время как влияние фотопериодичности на продуктивность водорослей исследовано недостаточно.

Цель данной работы – изучение особенностей роста хлореллы на новых, ранее не применяемых для культивирования водоросли средах, содержащих комплексные минеральные удобрения, а также поиск оптимального фотопериода для выращивания хлореллы.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования служила альгологически чистая культура *Chlorella vulgaris*, штамм IBCE C-19 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси [10]. Штамм способен эффективно расти на бедных средах, обладает наиболее выраженными планктонными свойствами, благодаря чему клетки этого штамма в наименьшей степени оседают на дно при культивировании.

Культуру клеток хлореллы выращивали в стеклянных прозрачных сосудах на среде, содержащей комплексные минеральные удобрения Kristalon (Yara International ASA, Нидерланды) трех составов (в %):

**состав № 1:** азот (N) – 19; фосфор (P) – 18; калий (K) – 18; магний (Mg) – 3. Микроэлементы: бор (B) – 0,025, медь (Cu) – 0,01, сера (S) – 5, цинк (Zn) – 0,025, молибден (Mo) – 0,004, железо (Fe) – 0,07, марганец (Mn) – 0,04;

**состав № 2:** азот (N) – 19; фосфор (P) – 6,0; калий (K) – 20; магний (Mg) – 3. Микроэлементы: бор (B) – 0,025, медь (Cu) – 0,01, сера (S) – 7,5, цинк (Zn) – 0,25, молибден (Mo) – 0,004, железо (Fe) – 0,07, марганец (Mn) – 0,04;

**состав № 3:** азот (N) – 19; фосфор (P) – 19,0; калий (K) – 19; магний (Mg) – 3. Микроэлементы: сера (S) – 2,4, цинк (Zn) – 0,5, медь (Cu) – 0,0025, молибден (Mo) – 0,0025, железо (Fe) – 0,2, марганец (Mn) – 0,0025.

В экспериментах по изучению влияния фотопериодичности на продуктивность хлореллы для культивирования водоросли использовали стандартную среду Тамия [8] следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 5,0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,25,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,003. На 1 л среды добавляли 1 мл раствора микроэлементов по Арнону [11]:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 2,86 г/л,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,81 г/л,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,22 г/л,  $\text{MoO}_3$  – 17,6 мг/л,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  – 22,96 мг/л, а также 44 мг/л этилендиамина-тетрауксусной кислоты, которая препятствует выпадению солей в осадок и способствует лучшему поглощению их клетками водоросли.

Во всех вариантах хлореллу выращивали в накопительном режиме в культуральных сосудах объемом 200 мл при освещении люминесцентными лампами дневного света TL-D36/54-765 с освещенностью 5000 лк в режиме 14 ч света – 10 ч темноты (кроме экспериментов по изучению влияния фотопериодичности на продуктивность хлореллы) и температуре  $+23 \pm 2$  °С. Суспензию клеток барботировали воздухом, обогащенным  $\text{CO}_2$  (1,5 %).

В опытах по изучению влияния фотопериодичности на продуктивность хлореллы использовали периоды свет/темнота, равные 14 : 10, 12 : 12 и 10 : 14 ч.

Продуктивность хлореллы определяли по поглощению и светорассеянию суспензии водоросли при 560 нм, которое обусловлено почти целиком только поглощением и светорассеянием клеток водоросли, находящихся в культуре, а не фотосинтетических пигментов (так как пигменты хлореллы в данной области свет не поглощают) и прямо пропорционально количеству клеток (продуктивности) [12]. Для перехода от оптической плотности при 560 нм к количеству клеток строили калибровочную кривую на основании измерения плотности суспензии и подсчета клеток в камере Горяева [13].

Количество фотосинтетических пигментов – хлорофилла ( $a + b$ ) и каротиноидов – определяли спектрофотометрическим методом по Vernon [14].

Измерения оптической плотности проводили на спектрофотометрах Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия) и Metertech SP830 plus (Metertech Inc., Тайвань).

В статье представлены результаты 3 независимых экспериментов, проведенных в 3-кратной биологической повторности. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot 11.2.

**Результаты и их обсуждение.** С целью оптимизации условий культивирования и состава питательных сред для выращивания хлореллы использовали комплексные минеральные удобрения Kristalon трех составов (№ 1–3), описанных выше. Данные составы являются наиболее оптимальными для культивирования протококковых водорослей, в том числе и хлореллы, из представленных на рынке комплексных минеральных удобрений, так как они содержат весь необходимый набор макро- и микроэлементов для нормального развития водоросли.

Результаты опытов по определению продуктивности хлореллы и содержанию в ее биомассе хлорофилла ( $a + b$ ) и каротиноидов при использовании трех составов удобрения Kristalon в количестве 0,5, 1,0, 2,5 и 5,0 г на 1 л воды представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Анализ полученных результатов показывает, что хлорелла достаточно активно развивалась на средах, содержащих минеральное удобрение всех трех использованных составов. Уже через 1 сут культивирования биомасса водоросли увеличивалась в 1,75–3,0 раза в зависимости от состава удобрения. Наиболее высокая продуктивность хлореллы в таких условиях была зафиксирована при использовании состава № 2 в количестве 2,5 г/л. В этом варианте в клетках хлореллы было обнаружено наибольшее количество фотосинтетических пигментов. Близкими по эффективности к составу № 2 (2,5 г/л) оказались также варианты № 1 (0,5 и 1,0 г/л) и № 3 (0,5 и 1,0 г/л).

Т а б л и ц а 1. Продуктивность хлореллы и содержание в ее биомассе хлорофилла (*a+b*) и каротиноидов при выращивании на минеральном удобрении Kristalon разного состава

Номер состава	Количество, г/л	Продуктивность		Хлорофилл ( <i>a+b</i> )		Каротиноиды	
		% к начальным значениям					
		1 сут	12 сут	1 сут	12 сут	1 сут	12 сут
1	0,5	251	399	203	331	214	345
	1,0	251	337	215	318	226	323
	2,5	177	207	212	231	190	225
	5,0	175	210	197	231	189	227
2	0,5	177	369	152	351	160	358
	1,0	211	313	178	319	188	322
	2,5	291	300	227	330	225	326
	5,0	189	234	207	255	198	252
3	0,5	246	374	195	314	207	331
	1,0	258	386	207	354	225	363
	2,5	195	174	213	200	205	173
	5,0	186	216	207	228	198	231

П р и м е ч а н и е. Представлены данные одного из типичных опытов.

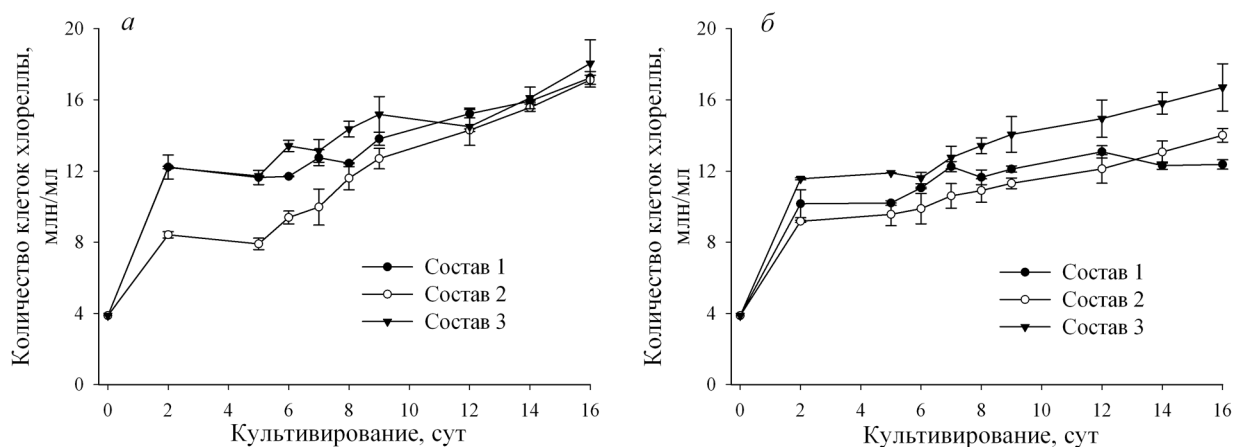


Рис. 1. Динамика накопления биомассы хлореллы, выращенной в течение 16 сут на питательных средах, содержащих разные составы Kristalon в количестве 0,5 г (*а*) или 1 г (*б*) в 1 л среды

При сопоставлении результатов, полученных через 12 сут культивирования, видно, что более высокая продуктивность водоросли и более высокое содержание фотосинтетических пигментов в ее биомассе приходится на составы № 1–3 с меньшей минерализацией культуральной среды – 0,5–1,0 г/л (см. табл. 1, рис. 1). При этом продуктивность водоросли и содержание в ее клетках фотосинтетических пигментов при использовании комплексного удобрения в количестве 0,5 и 1,0 г/л были практически одинаковыми. Поэтому для выращивания суспензии хлореллы в качестве биологически активной кормовой добавки к рационам кормления сельскохозяйственных животных целесообразно использовать питательную среду, содержащую в 1 л 0,5 г минерального удобрения Kristalon состава № 1–3.

Необходимо отметить также, что и после 12 сут культивирования продуктивность хлореллы продолжала увеличиваться, о чем свидетельствуют данные, представленные на рис. 1. Это указывает на то, что в среде еще достаточно питательных веществ для дальнейшего роста водоросли.

Отметим, что использование комплексных минеральных удобрений Kristalon в количестве 0,5 г/л (рис. 1, *а*) для приготовления питательной среды весьма перспективно с точки зрения экономии затрат на производство хлореллы, так как позволяет удешевить среду более чем в 2 раза по сравнению с классической средой Тамия при незначительном снижении продуктивности водоросли.

Кроме оптимизации питательной среды для выращивания хлореллы нами была исследована продуктивность водоросли при модификации режимов освещения. Интенсивность фотосинтеза автотрофов, а следовательно, и хлореллы определяет их продуктивность. Однако активно протекающие фотосинтетические процессы всегда сопровождаются образованием в хлоропластах активных форм кислорода, способных повреждать фотосинтетические мембраны [15]. Длительные темновые интервалы могут улучшить использование световой энергии (при включении света), потому что в течение темновых периодов автотрофный организм полностью восстановится от повреждений, которые часто являются следствием интенсивного фотосинтеза. Следовательно, чередование световых и темновых периодов при выращивании хлореллы является необходимым. Однако важным вопросом остается определение оптимальной продолжительности фотопериодов.

Мы сопоставили влияние на продуктивность хлореллы 3 режимов «свет-темнота» с разной продолжительностью световых и темновых периодов: 14 ч света – 10 ч темноты (14 : 10); 12 ч света – 12 ч темноты (12 : 12); 10 ч света – 14 ч темноты (10 : 14). При использовании этих фотопериодов была проанализирована продуктивность хлореллы в расчете на затраченную на освещение электроэнергию. Данные о количестве потребленной на освещение электроэнергии за весь промежуток времени выращивания хлореллы при разных фотопериодах представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Количество потребленной на освещение электроэнергии за весь промежуток времени выращивания хлореллы при разных фотопериодах

Фотопериод	Продолжительность опыта, сут		
	7	9	10
	Количество потребленной электроэнергии, кВт·ч		
14 : 10	14,11	18,14	20,16
12 : 12	12,10	15,55	17,28
10 : 14	10,08	12,96	14,40

Отметим, что из указанных выше фотопериодов режим 14 ч света – 10 ч темноты является наиболее часто используемым для выращивания фотосинтезирующих организмов, так как довольно адекватно моделирует фотопериодичность при их произрастании в естественных условиях. Кроме того, часто хлореллу выращивают при круглосуточном освещении, стремясь получить максимальное количество биомассы. Действительно, в некоторых случаях продуктивность водоросли возрастет, однако при этом непропорционально возрастают расходы на освещение.

Нами показано, что при выращивании хлореллы в режиме 10 : 14 продуктивность водоросли существенно снизилась по отношению к стандартному режиму освещения (14 : 10): за 5 сут культивирования – на 6,5 %, за 7 сут – на 50 % и за 9 сут – на 63 %. Экономия электроэнергии при таком фотопериоде составляет примерно 40 % к 9 дням культивирования водоросли, что не компенсирует потери от снижения продуктивности хлореллы. В связи с этим режим 10 : 14 для выращивания хлореллы является неперспективным.

Следует особо отметить, что различия в продуктивности водоросли при использовании режимов 14 : 10 и 12 : 12 оказались незначительными (рис. 2).

Так, после 10 сут культивирования продуктивность водоросли при режиме 14 : 10 составила 21,44 млн клеток хлореллы в мл суспензии, а при режиме 12 : 12 – 20,41 млн клеток/мл, т. е. была на 5 % ниже. Однако экономия электроэнергии (табл. 2) при таком способе культивирования составила 14 %. Таким образом, режим освещения 12 : 12 является

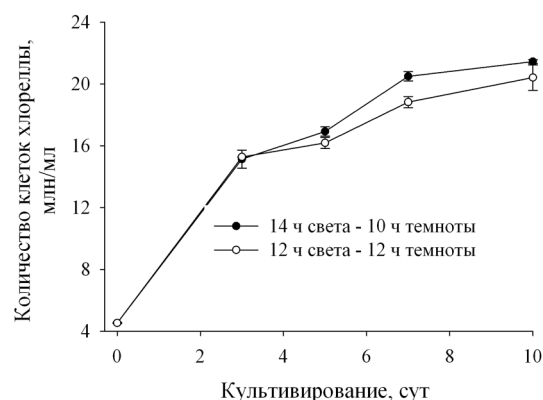


Рис. 2. Продуктивность хлореллы при выращивании в режимах освещения 14 ч света – 10 ч темноты и 12 ч света – 12 ч темноты

экономически более выгодным, нежели режим 14:10: на каждый затраченный кВт·ч электроэнергии синтезируется большее количество биомассы. Следовательно, при промышленном производстве биомассы хлореллы, требующем больших затрат электроэнергии, целесообразно использовать прерывистое освещение с фотопериодом 12:12.

**Заключение.** Показана возможность оптимизации условий выращивания хлореллы за счет использования более дешевой и простой с точки зрения технологического процесса питательной среды на основе комплексных минеральных удобрений Kristalon, а также путем модификации условий освещения водоросли, что позволит снизить затраты на ее производство.

## Литература

1. Музафаров А. М., Таубаев Т. Т. Культивирование и применение микроводорослей. Ташкент, 1984.
2. Плутахин Г. А., Мачнева Н. Л., Коцаев А. Г. и др. // Птицеводство. 2011. № 5. С. 23–25.
3. Богданов Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных. Пенза, 2006.
4. Шацких Е. В., Гафаров Ш. С., Бояринцева Г. Г. и др. Использование кормовых добавок в животноводстве: учебное пособие. Екатеринбург, 2006.
5. Шалыго Н. В., Мельников С. С. // Наука и инновации. 2009. № 3. С. 34–36.
6. Kang H. K., Salim H. M., Akter N. et al. // J. Appl. Poult. Res. 2013. Vol. 22. P. 100–108.
7. Halle I., Janczyk P., Freyer G. et al. // Archiva Zootechnica. 2009. Vol. 12, N 2. P. 5–13.
8. Moriyama T., Terasawa K., Sekine K. et al. // Microbiology. 2010. Vol. 156. P. 1730–1737.
9. Доманский В. П., Козел Н. В. // Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 3. С. 56–59.
10. Мельников С. С., Мананкина Е. Е., Будакова Е. А. и др. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей. Мн., 2011.
11. Hörtensteiner S., Chinner J., Matile P. et al. // Plant Molecular Biology. 2000. Vol. 42. P. 439–450.
12. Сидько Ф. Я., Ерошин И. С. // Управляемое культивирование микроводорослей / Под ред. Г. М. Лисовского. М., 1964.
13. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. // Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М., 1962. С. 43.
14. Vernon L. P. // Anal. Chem. 1960. Vol. 32, N 9. P. 1144–1150.
15. Li H., Tong Y., Li B. et al. // J. Genet. Genomics. 2010. Vol. 37, N 6. P. 399–412.

S. S. MELNIKOVA, E. E. MANANKINA, T. V. SAMOVICH, N. V. KOZEL, N. V. SHALYGO

## OPTIMIZATION OF GROWING CONDITIONS OF CHLORELLA

### Summary

It was shown that it is possibility to optimize growing conditions of chlorella using culture medium on the basis of complex fertilizers Kristalon, which is cheaper and simpler in terms of process, as well as modifying the lighting conditions of algae, which will reduce the cost of its production.