

**ПОТРЕБЛЕНИЕ АЗОТА И ФОСФОРА МИКРОВОДОРОСЛЮ
DUNALIELLA SALINA ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Исследована динамика биомассы вида *Dunaliella salina* (Dunal) Teod. при выращивании на среде Тренкеншу в накопительной и квазинепрерывной культуре с удельной скоростью протока 10 % сутки⁻¹. Приведены средние скорости потребления азота и фосфора на различных этапах выращивания. Рассчитано соотношение потребляемых биогенов N:P в различные периоды культивирования. Вычислен экономический коэффициент для азота и фосфора.

Зеленая галофильная микроводоросль *Dunaliella salina* широко известна как один из наиболее перспективных природных источников β-каротина и глицерина [10, 11]. Этот вид культивируется в промышленных масштабах в ряде стран, начиная с пятидесятых годов прошлого века. Тем не менее, проблема оптимизации состава питательной среды с целью увеличения выхода биомассы и содержания в ней β-каротина остается актуальной до настоящего времени. В нашей работе для выращивания *D. salina* была использована среда Тренкеншу [8], разработанная для получения плотных культур, и отличающаяся от большинства рекомендуемых сред [10, 11], повышенным содержанием азота, фосфора, микроэлементов и отсутствием источника углерода.

Известно, что скорости потребления питательных веществ микроводорослями зависят не только от исходных концентраций солей в растворе, но и от многих других параметров: освещенности, температуры, морфо-физиологических особенностей штаммов и других факторов. Вследствие этого, в каждом конкретном случае характер динамики содержания биогенных элементов в среде в ходе развития культур может иметь свои особенности [3, 12, 13]. Кроме того, в промышленных условиях важным показателем использования питательных субстратов является экономический коэффициент, позволяющий оценить потребности биологического объекта в субстрате.

Целью данной работы являлось исследование динамики потребления азота и фосфора клетками *D. salina*, соотношения N:P при выращивании на питательной среде Тренкеншу в накопительном и квазинепрерывном режиме и вычисление экономического коэффициента для азота и фосфора.

Материал и методы. Объектом исследования являлась галобная микроводоросль *Dunaliella salina* из коллекции культур ИнБИОМ НАН Украины. Питательной средой служила модифицированная среда Тренкеншу: NaNO_3 – 1,8 г/л; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г/л; Na_2EDTA – 0,03 г/л; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,042 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,008 г/л; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,00625 г/л; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,00183 г/л; $\text{K}_2\text{C}_{12}(\text{SO}_4)_2 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ – 0,00238 г/л; TiO_2 – 0,00058 г/л с добавлением NaCl – 45 г/л. Система для культивирования описана в статье [1]. Эксперимент проводился в 3-х повторностях. Объем суспензии в каждом культиваторе равнялся 10 л. При выращивании *D. salina* использовался барботаж воздушной смесью с добавлением углекислоты, которую добавляли в качестве стабилизатора pH (8 - 9 ед.) и для обеспечения культуры углеродом. Освещенность на поверхности культур составляла в среднем 21 кЛк, температура питательного раствора изменялась в диапазоне от 26 до 28°C. На начальном этапе эксперимента водоросли выращивали накопительным методом. Начиная с 6 дня, эксперимент продолжили в квазинепрерывном режиме с удельной скоростью протока 10% сутки⁻¹. На 9-й день эксперимента режим подачи углекислоты изменили на периодический, т.е. осуществляли 4-х разовую подачу углекислоты в течение дня по 30 мин. Данный режим поддерживали до 20-го дня. Измерения оптической плотности D_{750} проводили на КФК-2 в 0,5 см кюветах. Для определения концентрации клеток использовали формулу перехода $N = k \cdot D_{750}$, где N – число клеток в млн/мл., а коэффициент пересчета $k = 6,39$. Определения содержания

© А. В. Бородина, А. Б. Боровков, 2005

в среде нитратов, нитритов и фосфатов производили в соответствии со стандартными гидрохимическими методиками [5]. Перед проведением анализов пробы центрифугировали 15 минут при 1,5 тыс. оборотах для осаждения микроводорослей. Удельную скорость роста культуры определяли по формуле:

$$\mu = \frac{\Delta N}{\Delta T} \cdot \frac{1}{N_0},$$

где N_0 - начальная концентрация клеток ($\times 10^9$ кл/л); ΔN - изменение концентрации клеток ($\times 10^9$ кл/л) за время ΔT (в сутках). Среднее значение продуктивности водоросли на линейном участке кривой роста оценивали как тангенс угла наклона по формуле:

$$N = P \cdot t + N_0,$$

где N_0 и N - начальная и конечная концентрация клеток ($\times 10^9$ кл/л), P - продуктивность ($\times 10^9$ кл·л·сутки⁻¹), t - время (сутки) [7]. Скорость потребления биогена рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\Delta B}{N_{cp} \cdot \Delta T},$$

где ΔB - потребленный биоген, N_{cp} - средняя численность клеток, ΔT - промежуток времени [6]. Экономический коэффициент рассчитывали по формуле:

$$Y = \frac{\Delta b}{\Delta s},$$

где Δb - приращение биомассы (г), Δs - убыль субстрата (г). Расчет биомассы осуществлялся по формуле пересчета от оптической плотности к сухому весу [2].

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведена динамика численности клеток *D. salina* (средняя из трех повторностей) на протяжении всего эксперимента.

Накопительный режим культивирования за первые сутки роста характеризуется

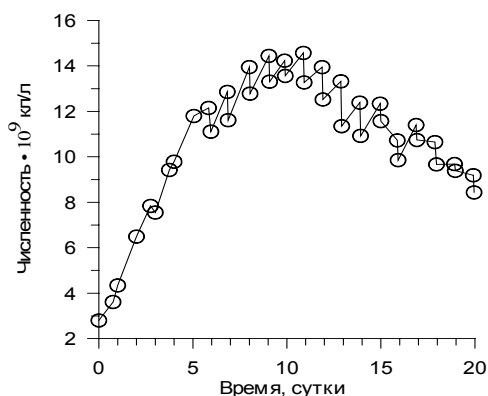


Рисунок 1. Динамика численности клеток *D. salina* при выращивании в накопительном и квазинепрерывном режимах
Figure 1. Dynamics of *D. salina* cells number at the batch and semicontinuous cultivation

отсутствием лаг-периода. Линейный рост водорослей наблюдался с 1 по 5 сутки, со средней удельной скоростью роста 0,35 сутки⁻¹ и продуктивностью $2,66 \cdot 10^9$ кл·л⁻¹·сутки⁻¹. Средние скорости потребления азота и фосфора на клетку были максимальными и составляли $3,44 \cdot 10^{-9}$ мг·N·кл⁻¹·сутки⁻¹ и $0,80 \cdot 10^{-9}$ мг·P·кл⁻¹·сутки⁻¹, соответственно, при соотношении потребленного N к потребленному P равном 4,31. На 5-е сутки эксперимента концентрация нитратного азота в среде снизилась в 2,9 раза (до $103,4$ мг·N·л⁻¹), а фосфора – в 4 раза (до $14,9$ мг·P·л⁻¹), содержание нитритов выросло до $26,9$ мг·N·л⁻¹. Экономический коэффициент за данный период составил для азота – 3,52, для фосфора – 16,48. Таким образом, соотношение потребления азота к фосфору составляло 4,7.

При достижении культурой плотности $12,15 \cdot 10^9$ кл·л⁻¹ на 6-е сутки,

режим культивирования был изменен на квазинепрерывный с удельной скоростью потока 10 % в сутки. С 6-х по 10-е сутки плотность культуры продолжала увеличиваться до $14,57 \cdot 10^9$ кл·л⁻¹, однако ростовые характеристики снизились: средняя удельная скорость роста до 0,16 сутки⁻¹, а продуктивность до $1,4 \cdot 10^9$ кл·л⁻¹·сутки⁻¹. Скорость потребления азота и фосфора на клетку снизилась (примерно в полтора раза) и составляла для азота $2,21 \cdot 10^{-9}$ мг·N·кл⁻¹·сутки⁻¹, а для фосфора $0,53 \cdot 10^{-9}$ мг·P·кл⁻¹·сутки⁻¹. При этом биогены поглощались из среды примерно в таком же соотношении, как и в предшествующий пе-

риод (коэффициент N:P снизился незначительно с 4,31 до 4,2). Направленность динамики содержания биогенов в среде в течение этого периода эксперимента отличалась от периода накопительной культуры. В результате ежедневного 10 % обмена и снижения скоростей потребления клетками азота и фосфора их концентрация не только не снизилась, но и несколько увеличилась и на 10-е сутки составила 135 мг·N·л⁻¹ и 16,4 мг·P·л⁻¹. Содержание нитритов снизилось почти в 3 раза. Экономический коэффициент (для N и P) на этом этапе культивирования составил 2,62 и 12,43, соответственно. Это свидетельствует о том, что потребность в азоте на данном этапе культивирования выше потребности в фосфоре в 4,8 раза.

Таблица. Динамика средней скорости потребления азота и фосфора и коэффициента N : P при различных режимах культивирования *D. salina*

Table. Dynamics of average uptake rate of nitrogen and phosphorus and the ratio N : P at various models cultivations of *D. salina*

№ культиватора	Накопительный режим культивирования			Квазинепрерывный режим культивирования					
	Средняя скорость потребления биогенов на 1 клетку		Соотношение поглощения N:P	6 - 10 дни эксперимента			11 - 20 дни эксперимента		
				Средняя скорость потребления биогенов на 1 клетку		поглощение N:P	Средняя скорость потребления биогенов на 1 клетку		поглощение N:P
				×10 ⁻⁹ мг- N/л	×10 ⁻⁹ мг- P/л		×10 ⁻⁹ мг- N/л	×10 ⁻⁹ мг- P/л	
I	3,62	0,88	4,12	2,06	0,57	4,58	2,13	0,48	4,43
II	3,52	0,80	4,40	2,34	0,56	4,11	2,13	0,46	4,63
III	3,18	0,72	4,42	2,22	0,45	3,96	1,64	0,38	4,31
среднее	3,44	0,80	4,31	2,21	0,53	4,20	1,96	0,44	4,46

За период с 11-х по 20-е сутки продуктивность и удельная скорость роста снизились в 3,4 и 4 раза, по сравнению с предыдущим периодом. В питательной среде наблюдалось изменение концентрации нитратного азота от 128 до 115 мг-ат/л, тогда как содержание нитритов за этот период увеличилось до 35,2 мг-ат/л, а концентрация фосфора выросла до 23,25 мг-ат/л. Скорости потребления азота и фосфора уменьшились лишь в 1,3 и 1,2 раза и составили 1,96·10⁻⁹ мг·N·кл⁻¹·сутки⁻¹ и 0,44·10⁻⁹ мг·P·кл⁻¹·сутки⁻¹ при соотношении потребленного N и P равном 4,46. Экономический коэффициент за этот период выращивания микроводорослей для азота и фосфора равнялся 2,48 и 11,43, отношение поглощаемых N и P в пересчете на прирост биомассы изменилось до 4,6.

К концу эксперимента уровень нитратного азота в среде был выше, чем в момент перехода на квазинепрерывный режим на 11 %, а уровень фосфора - на 56 %.

Из полученных в ходе эксперимента результатов следует, что на среде Тренкеншу (при пересчете экономического коэффициента на NaNO₃ и NaH₂PO₄·2H₂O), можно получить 1,04 (по азоту) и 0,98 (по фосфору) грамма сухого вещества *D. salina* с 1 литра питательной среды. Исходя из известного содержания азота и фосфора в биомассе *D. salina* можно теоретически рассчитать количество солей, необходимых для выращивания единицы биомассы микроводоросли данного вида. В [4] приводятся следующие доли содержания элементов в сухой биомассе: 0,1 азота и 0,03 фосфора. Пересчет показывает, что на образование 1 г *D. salina* потребуется, как минимум, 0,607 г NaNO₃ и 0,151 г NaH₂PO₄·2H₂O. Из практического опыта интенсивного культивирования другой зеленой микроводоросли - *Chlorella vulgaris* [9] известно, что из среды биогенов изымается больше, чем встраивается во внутренние структуры клеток. Этим можно объяснить расхождение теоретических и эмпирических данных. Данные гидрохимического

исследования подтверждаются анализом ростовых кривых, который свидетельствует о максимальной продуктивности культуры $0,99 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сутки}^{-1}$, т. е. достаточности $1,8 \text{ г}$ нитрата натрия и $0,3 \text{ г}$ гидрофосфата натрия для получения $0,99 \text{ г}$ биомассы *D. salina* с 1 л питательной среды Тренкеншу.

Заключение. Максимальные скорости поглощения азота и фосфора клетками *D. salina* из среды наблюдались в период наиболее активного роста культур. Снижение скоростей потребления азота и фосфора и продуктивности культуры на этапе квазине-прерывного режима не связано с дефицитом этих элементов в среде, так как их концентрация до конца эксперимента оставалась достаточно высокой. При данном уровне освещенности (21 кЛк) наиболее вероятной причиной ингибирования роста могло быть недостаточное обеспечение клеток углеродом. На протяжении всего эксперимента клетки водоросли поглощали азот и фосфор из среды в примерно в одном и том же соотношении $4,2 : 1 - 4,5 : 1$ – при расчете на среднее число клеток или $4,6 : 1 - 4,8 : 1$ – при расчете на прирост биомассы, т.е. в соотношении, близком к их соотношению в среде Тренкеншу ($4,9 : 1$). Определенный экономический коэффициент для азота и фосфора свидетельствует о возможности получения $0,98 \text{ г}$ сухого вещества *D. salina* с 1 л питательной среды Тренкеншу.

1. Геворгиз Р. Г., Шахматов А. П. Установка для культивирования морских микроводорослей // Экология моря. - 2005. – Вып. 67. – С. 44 – 47.
2. Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б. Динамика биомассы *Dunaliella salina* в условиях непрерывного культивирования // Экология моря. - 2005. – Вып. 67. – С. 35 – 37.
3. Левич А. П., Ревкова Н. В., Булгаков Н. Г. Процесс «потребление-рост» в культурах микроводорослей и потребности клеток в компонентах минерального питания // Экологический прогноз (под. ред. В. Н. Максимова). – М.: Изд-во Моск. Ун-та, 1986. – С. 132 - 140.
4. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. – К: Наук. думка, 1973. – 487 с.
5. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 119 с.
6. Ревкова Н. В. Сравнение роста водорослей в моно- и поликультурах на средах с разным содержанием фосфора // Биологические науки. – 1987. – № 6. – С. 79 – 82.
7. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: автореф. дисс. канд. биол. наук. - Красноярск, 1984. - 37 с.
8. Тренкеншу Р. П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // – Биология моря. – 1979. - № 51. – С. 41 - 46.
9. Унутис В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. – Рига: Зинатне, 1983. – 320 с.
10. Borowitzka M. A. Algal media and sources of algal cultures // MicroAlgal Biotechnology / Ed. M. A. Borowitzka, L. J. Borowitzka. - Cambridge: Cambridge University Press, 1988. - P. 456 - 465.
11. Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil* // Plant cell Physiol. – 1990. – 31 (5). – P. 689 - 696.
12. Wynne D., Rhee G. Y. Effects of light intensity and quality on the relative N and P requirement (the optimum N : P ratio) of marine planktonic algae // J. Plankton Res. - 1986. - 8, № 1. - P. 91 - 103.
13. Wynne D., Rhee G. Y. Effects of light intensity and quality on the relative requirement of N and P // International symposium on Marine plankton. - 1985. - 37, № 2. – P. 780.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 07.06.2005

A. V. BORODINA, A. B. BOROVKOV

NITROGEN AND PHOSPHORUS UPTAKE BY *DUNALIELLA SALINA* AT VARIOUS CULTIVATIONS

Summary

The dynamics of *Dunaliella salina* biomass is shown at cultivation on Trenkenshu medium in batch and continuous culture with specific rate of a channel $0,1 \text{ day}^{-1}$. Average uptake rates of nitrogen and phosphorus on a cell at various stages of cultivation are determined. Uptake ratio N:P is counted for the various periods cultivations. The economic coefficient for nitrogen and phosphorus is calculated.