

**МОДИФИКАЦИЯ СРЕДЫ ЗАРРУКА ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ  
SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS**

Проведен теоретический химический анализ питательной среды Заррука с целью выяснения состава осадка, выпадающего при ее приготовлении. Рассчитано необходимое количество комплексобразователя, для предотвращения образования осадка. Показана зависимость плотности биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler, от различного содержания ЭДТА в среде Заррука.

*S. platensis* является одним из наиболее изученных видов цианобактерий с точки зрения биотехнологии культивирования микроводорослей. Однако, некоторые вопросы минерального обеспечения, до сих пор остаются не вполне ясными.

Для выращивания спирулины как в промышленных, так и в лабораторных условиях наиболее часто используют питательную среду Заррука [6]. Известно, что приготовление среды Заррука нередко сопровождается выпадением осадка, особенно в промышленных условиях при использовании водопроводной или скважинной воды, что сказывается на экономической эффективности процесса культивирования микроводорослей.

Решение данной проблемы предполагает проведение теоретического химического анализа питательной среды Заррука с целью выяснения возможного состава осадка и количества этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА), необходимого для предотвращения образования осадка, а также исследования влияния различных концентраций комплексобразователя на ростовые характеристики *S. platensis*.

Выполненные нами физико-химические расчеты были представлены в заявке на авторское изобретение «Живильне середовище для культивування *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl.» № а 2006 00073 от 28.12.05

**Материал и методы.** При аналитических расчетах использовали справочные данные [4] с учетом высокой ионной силы питательного раствора. Коэффициенты активности ( $f_a$ ) основных ионов ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) определяли путем экстраполяции логарифмических функций, аппроксимирующих табличные значения  $f_a$ . По полученным величинам рассчитывали соответствующие произведения активности и сравнивали с табличными ПР солей. Расчет произведения активностей ионов в среде Заррука производили по формуле:

$$a_{\text{K}^+}^m \cdot a_{\text{A}^-}^n = (f_{\text{K}^+} \cdot C_{\text{K}^+})^m \cdot a_{\text{A}^-}^n,$$

где  $a_{\text{K}^+}$ ,  $a_{\text{A}^-}$  – активности катиона и аниона;  $m$ ,  $n$  – число катионов и анионов на одну формульную единицу, соответственно;  $f_{\text{K}^+}$ ,  $C_{\text{K}^+}$  – коэффициент активности и молярная концентрация катионов, соответственно [3, 4]. Для расчета необходимого количества ЭДТА были определены константы равновесия реакций (1) и (2), а также составлен материальный баланс кальция (с учетом  $f_a$ , рассчитанного по уравнению Девис [3, 4]).

После теоретических расчетов необходимого количества ЭДТА был проведен эксперимент по влиянию концентраций этого комплексобразователя на рост *S. platensis* штамм IBSS – 33 из коллекции ИнБЮМ НАН Украины.

Спирулину выращивали накопительным методом в литровых колбах при объеме суспензии 0,5 л на люминистате при непрерывном освещении снизу и барботаже воздухом 180 мл мин<sup>-1</sup>. Освещенность составляла 5,0 - 5,4 кЛк, температура среды 23 – 25<sup>0</sup>С. Содержание абсолютно сухого вещества (АСВ) в литре суспензии определяли фотометрическим методом [5]. Оптическую плотность измеряли на КФК-2, при длине волны 750 нм.

**Результаты и обсуждение.** При приготовлении среды Заррука, в последовательности указанной автором, устанавливается pH = 8,7. Так как ионная сила раствора достаточно велика (Y = 0,273), при физико-химических расчетах необходимо учитывать активности ионов [3]. Раствор имеет слабощелочную реакцию:  $a_{OH^-} = \frac{10^{-14}}{a_{H^+}} = 5,011 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Нами были найдены коэффициенты активностей основных ионов при ионной силе раствора 0,27:  $f_{HPO_4^{2-}} = 0,23$ ;  $f_{Mg^{2+}} = 0,36$ ;  $f_{Ca^{2+}} = 0,30$ ;  $f_{Fe^{2+}} = 0,30$ ;  $f_{Fe^{3+}} = 0,15$   $f_{HCO_3^-} = 0,69$ .

При анализе основного состава среды особое внимание необходимо уделить карбонатному и фосфатному равновесию.

Карбонатное равновесие:  $HCO_3^- + OH^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_2O$ ;

$$K_r = \frac{a_{CO_3^{2-}}}{a_{HCO_3^-} \cdot a_{OH^-}} = \frac{K_r}{K_w} = \frac{4,8 \cdot 10^{-11}}{10^{-14}} = 4,8 \cdot 10^{-3},$$

где  $K_r$  – константа гидролиза. Учитывая, что  $a_{OH^-} = 5,011 \cdot 10^{-6}$  моль/л,  $[HCO_3^-] = 0,1999$ ,  $f_{HCO_3^-} = 0,69$ ; активность карбонат-ионов будет равна  $a_{CO_3^{2-}} = 3,3 \cdot 10^{-9}$  моль/л.

Фосфатное равновесие:  $HPO_4^{2-} + OH^- \rightleftharpoons PO_4^{3-} + H_2O$ ;

$$K_r = \frac{a_{PO_4^{3-}}}{a_{HPO_4^{2-}} \cdot a_{OH^-}} = \frac{K_3}{K_w} = \frac{1,26 \cdot 10^{-12}}{10^{-14}} = 126$$

Учитывая, что  $[HPO_4^{2-}] = 0,00287$ ;  $f_{HPO_4^{2-}} = 0,23$ ; тогда  $a_{PO_4^{3-}} = 4,11 \cdot 10^{-7}$  моль/л.

С целью выяснения состава образующегося осадка были рассчитаны произведения активностей ионов в среде Заррука и сравнены с табличными произведениями растворимости образующихся солей (табл. 1).

**Таблица 1. Определение состава осадка при сравнении произведения активностей ионов в среде Заррука без комплексообразователя с табличными величинами ПР солей**

**Table 1. Determination of structure of a deposit at comparison of activity product ions in Zarrouk medium without chelation with tabulated value product dissolubility of salts**

Химическая формула	Произведения активностей ионов в среде Заррука	ПР табличная	Образование осадка
CaCO <sub>3</sub>	3,56·10 <sup>-13</sup>	4,8·10 <sup>-9</sup>	Невозможно
CaHPO <sub>4</sub>	7,04·10 <sup>-8</sup>	2,7·10 <sup>-7</sup>	Возможно
Ca(OH) <sub>2</sub>	2,71·10 <sup>-15</sup>	5,5·10 <sup>-6</sup>	Невозможно
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	7,88·10 <sup>-24</sup>	2·10 <sup>-29</sup>	Осадок образуется
FeCO <sub>3</sub>	3,56·10 <sup>-14</sup>	3,47·10 <sup>-11</sup>	Невозможно
Fe(OH) <sub>2</sub>	2,71·10 <sup>-16</sup>	10 <sup>-15</sup>	Возможно
Fe(OH) <sub>3</sub>	1,36·10 <sup>-21</sup>	3,2·10 <sup>-38</sup>	Осадок образуется
FePO <sub>4</sub>	1,48·10 <sup>-11</sup>	1,3·10 <sup>-22</sup>	Возможно
Mg(OH) <sub>2</sub>	7,32·10 <sup>-15</sup>	1,8·10 <sup>-11</sup>	Невозможно
MgCO <sub>3</sub>	9,62·10 <sup>-13</sup>	4·10 <sup>-5</sup>	Невозможно
Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	4,19·10 <sup>-24</sup>	10 <sup>-13</sup>	Невозможно
CaSO <sub>4</sub>	7,07·10 <sup>-7</sup>	2,5·10 <sup>-5</sup>	Невозможно

Таким образом, при приготовлении среды без комплексообразователя (ЭДТА) выпадает осадок, в состав которого могут входить  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ,  $\text{FePO}_4$ . Добавление же в среду 0,08 г/л ( $2,15 \cdot 10^{-4}$  моль/л) ЭДТА недостаточно, чтобы связать ионы  $\text{Fe}^{2+}$  ( $3,6 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и  $\text{Ca}^{2+}$  ( $3,6 \cdot 10^{-4}$  моль/л), реагирующие с ЭДТА в соотношении 1:1 в растворимые комплексы, и, тем самым, препятствовать выпадению осадка.

Образование всей массы осадка происходит, однако, не сразу. Появление Fe (III) связано с процессом окисления ионов  $\text{Fe}^{2+}$  в щелочной среде, лимитирующей стадией которого является транспорт кислорода в растворе. Поэтому выпадение буроватого осадка  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  происходит, как правило, на следующие сутки или позже:



Окислительный и восстановительный процессы этой реакции характеризуются потенциалами  $E_2$  и  $E_1$ .

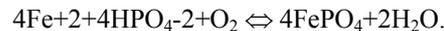
$$\begin{cases} \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4e^- \leftrightarrow 4\text{OH}^-; E_1 = E^\circ_{\text{O}_2/\text{OH}^-} + \frac{RT}{4F} \ln \frac{p_{\text{O}_2}}{a_{\text{OH}^-}^4}; \\ \text{Fe}^{2+} + 3\text{OH}^- \leftrightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 + 1e^-; \\ E_2 = E^\circ_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{Fe}^{3+}}}{a_{\text{Fe}^{2+}}} = E^\circ_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{\text{ПП}_{\text{Fe}(\text{OH})_3}}{a_{\text{Fe}^{2+}} a_{\text{OH}^-}^3}. \end{cases}$$

Поскольку парциальное давление кислорода в воздухе  $p_{\text{O}_2} = 0,21 \text{ атм}$ , то

$$E_1 = 0,401 + \frac{8,314 \cdot 293}{4 \cdot 96500} \ln \frac{0,21}{(5,011 \cdot 10^{-6})^4} = 0,699 \text{ В},$$

$$E_2 = 0,771 + \frac{8,314 \cdot 293}{96500} \ln \frac{3,2 \cdot 10^{-38}}{0,3 \cdot 3,6 \cdot 10^{-5} \cdot (5,011 \cdot 10^{-6})^3} = -0,196 \text{ В}.$$

Параллельно данному процессу теоретически может происходить и окисление  $\text{Fe}^{2+}$  в  $\text{FePO}_4$ :



Потенциалы окислительно-восстановительных процессов в этом случае будут

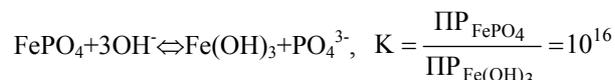
$$\begin{cases} \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4e^- \leftrightarrow 4\text{OH}^-, E_1 = E^\circ_{\text{O}_2/\text{OH}^-} + \frac{RT}{4F} \ln \frac{p_{\text{O}_2}}{a_{\text{OH}^-}^4}; \\ \text{OH}^- + \text{Fe}^{2+} + \text{HPO}_4^{2-} \leftrightarrow \text{FePO}_4 + \text{H}_2\text{O} + 1e^-; \\ E_2 = E^\circ_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{Fe}^{3+}} a_{\text{PO}_4^{3-}} K_w}{a_{\text{Fe}^{2+}} a_{\text{HPO}_4^{2-}} a_{\text{OH}^-} K_3} = E^\circ_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{\text{ПП}_{\text{FePO}_4} K_w}{a_{\text{Fe}^{2+}} a_{\text{HPO}_4^{2-}} a_{\text{OH}^-} K_3}. \end{cases}$$

$$E_1 = 0,699 \text{ В},$$

$$E_2 = 0,771 + \frac{8,314 \cdot 293}{96500} \ln \frac{1,3 \cdot 10^{-22} \cdot 10^{-14}}{0,3 \cdot 3,6 \cdot 10^{-5} \cdot 0,227 \cdot 2,87 \cdot 10^{-3} \cdot 5,011 \cdot 10^{-6} \cdot 1,3 \cdot 10^{-12}} = 0,158 \text{ В}.$$

Сравнение двух окислительно-восстановительных потенциалов  $E_2$  указанных процессов образования  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  и  $\text{FePO}_4$  приводит к заключению, что в термодинамическом отношении в среде предпочтительней будет протекать восстановительная полуреакция с меньшим потенциалом, т.е. ведущая к образованию  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . Если, фосфат желе-

за (III) в некотором количестве и образуется, то термодинамически он будет неустойчив, поскольку легко переходит в гидроксид железа (III) по реакции:



Константа равновесия этой реакции достаточно велика, таким образом, равновесие сминуто вправо. Наступление равновесия в процессе образования гидроксида железа (III) приводит к равенству окислительно-восстановительных потенциалов:

$$E^\circ_{\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}} + \frac{RT}{F} \ln \frac{\text{PP}_{\text{Fe}(\text{OH})_3}}{a_{\text{Fe}^{2+}} a_{\text{OH}^-}^3} = E^\circ_{\text{O}_2/\text{OH}^-} + \frac{RT}{4F} \ln \frac{p_{\text{O}_2}}{a_{\text{OH}^-}^4}$$

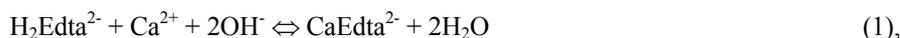
Подставляя в уравнение табличные и определенные значения величин, находим активность ионов  $\text{Fe}^{2+}$ :

$$0,771 + \frac{8,314 \cdot 293}{96500} \ln \frac{3,2 \cdot 10^{-38}}{a_{\text{Fe}^{2+}} \cdot (5,011 \cdot 10^{-6})^3} = 0,401 + \frac{8,314 \cdot 293}{4 \cdot 96500} \ln \frac{0,21}{(5,011 \cdot 10^{-6})^4}$$

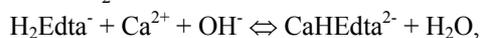
$a_{\text{Fe}^{2+}} = 4,4 \cdot 10^{-21}$  моль/л. Следовательно, при наступлении химического равновесия в отсутствие комплексообразователя железо осаждается практически полностью.

Для предотвращения образования осадков солей железа и кальция необходимо образование растворимых комплексов с данными катионами. Комплексообразователь (обозначенный в уравнении как  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Edta}$ ) вводится в среду перед добавлением солей железа и кальция, чтобы не допустить образование осадка.

Расчет количества ЭДТА для связывания кальция и железа. При добавлении ЭДТА в среде наблюдаются следующие равновесия:



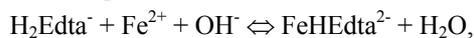
$$K'_1 = \frac{a_{\text{CaEdta}^{2-}}}{a_{\text{H}_2\text{Edta}^{2-}} a_{\text{OH}^-}^2 a_{\text{Ca}^{2+}}} = \frac{K_{\text{CaEdta}^{2-}}}{K_w^2} K_3 K_4 = 2,34 \cdot 10^{21};$$



$$K''_1 = \frac{a_{\text{CaHEdta}^-}}{a_{\text{H}_2\text{Edta}^-} a_{\text{OH}^-} a_{\text{Ca}^{2+}}} = \frac{K_{\text{CaHEdta}^-}}{K_w} K_3 = 1,72 \cdot 10^{11};$$



$$K'_2 = \frac{a_{\text{FeEdta}^{2-}}}{a_{\text{H}_2\text{Edta}^{2-}} a_{\text{OH}^-}^2 a_{\text{Fe}^{2+}}} = \frac{K_{\text{FeEdta}^{2-}}}{K_w^2} K_3 K_4 = 9,55 \cdot 10^{24};$$

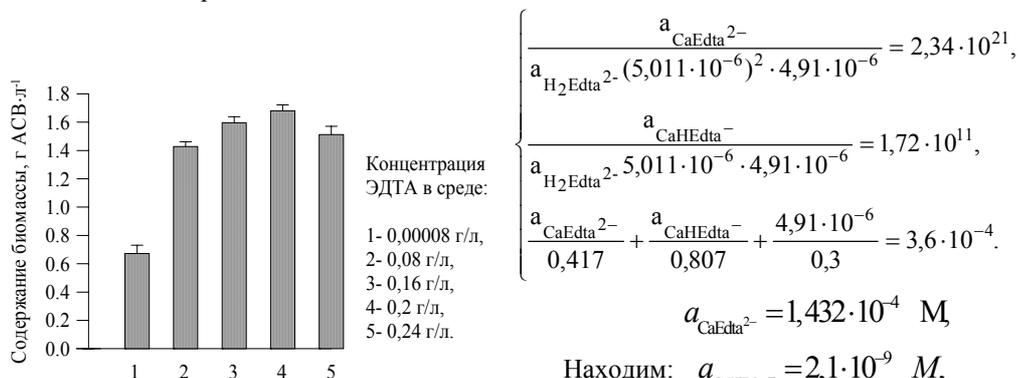


$$K''_2 = \frac{a_{\text{FeHEdta}^-}}{a_{\text{H}_2\text{Edta}^-} a_{\text{OH}^-} a_{\text{Fe}^{2+}}} = \frac{K_{\text{FeHEdta}^-}}{K_w} K_3 = 3,86 \cdot 10^{14},$$

где  $K_{\text{CaEdta}^{2-}} = 3,89 \cdot 10^{10}$ ,  $K_{\text{CaHEdta}^-} = 3236$ ,  $K_{\text{FeEdta}^{2-}} = 1,585 \cdot 10^{14}$ ,  $K_{\text{FeHEdta}^-} = 7,24 \cdot 10^6$  – константы устойчивости соответствующих комплексных ионов;  $K_3 = 5,33 \cdot 10^{-7}$ ,  $K_4 = 1,13 \cdot 10^{-11}$  – константы ионизации этилендиаминтетрауксусной кислоты по третьей и четвертой ступени.

Сравнение констант равновесия позволяет сделать вывод, что вначале в комплекс переходят ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и, лишь когда все железо (II) будет связано в комплексный ион, ЭДТА начнет реагировать с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Чтобы осадок соли кальция не образовывался,

вался, активность ионов  $\text{Ca}^{2+}$  должна быть меньше критической, которую можно определить из произведения растворимости наименее растворимого в данной среде соединения кальция (среднего фосфата), т.е. меньше  $4,91 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Подставляя вместо концентраций отношения активностей к коэффициентам активности, рассчитываемым по уравнению Девис [3, 4] для комплексов кальция, мы можем решить систему уравнений, образованных из равновесий комплексообразования с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и материального баланса кальция в среде:



**Рисунок 1. Плотность накопительных культур *S. platensis* на стационарной фазе роста в вариантах с различным содержанием ЭДТА в среде Заррука**  
**Figure 1. Density of batch cultures of *S. platensis* on a stationary growth phase in variants with various EDTA contents in Zarrouk medium**

$$\begin{cases} \frac{a_{\text{CaEdta}^{2-}}}{a_{\text{H}_2\text{Edta}^{2-}} (5,011 \cdot 10^{-6})^2 \cdot 4,91 \cdot 10^{-6}} = 2,34 \cdot 10^{21}, \\ \frac{a_{\text{CaHEdta}^-}}{a_{\text{H}_2\text{Edta}^{2-}} \cdot 5,011 \cdot 10^{-6} \cdot 4,91 \cdot 10^{-6}} = 1,72 \cdot 10^{11}, \\ \frac{a_{\text{CaEdta}^{2-}}}{0,417} + \frac{a_{\text{CaHEdta}^-}}{0,807} + \frac{4,91 \cdot 10^{-6}}{0,3} = 3,6 \cdot 10^{-4}. \end{cases}$$

$$a_{\text{CaEdta}^{2-}} = 1,432 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

Находим:  $a_{\text{CaHEdta}^-} = 2,1 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ,

$$a_{\text{H}_2\text{Edta}^{2-}} = 4,96 \cdot 10^{-10} \text{ M}.$$

Это свидетельствует о том, что практически весь ЭДТА перешел в наиболее устойчивый комплекс.

Очевидно, общая концентрация всех форм и комплексов ЭДТА в растворе должна быть равна сумме концентраций  $\text{CaEdta}^{2-}$  и

$\text{FeEdta}^{2+}$ :  $\frac{a_{\text{CaEdta}^{2-}}}{0,417} + C_{\text{Fe}^{2+}} = 3,8 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Таким образом, 0,143 г/л дигидрата динатриевой соли ЭДТА необходимо вносить в среду для предотвращения осаждения малорастворимых соединений.

При проведении эксперимента, начальные концентрации ЭДТА в среде Заррука составляли (в г/л): 1) 0,00008, 2) 0,08 (контроль), 3) 0,16, 4) 0,2, 5) 0,24. Незначительное превышение теоретически рассчитанной концентрации ЭДТА в варианте (3) объясняется возможным дополнительным присутствием солей в воде и выветриванием кристаллогидратов при их хранении.

На рис. 1 показана максимальная плотность, достигнутая культурами на стационарной фазе роста, в зависимости от исходного содержания ЭДТА в среде Заррука. Приготовление сред в первых двух случаях сопровождалось выпадением осадка.

Исходя из результатов, представленных на рисунке, оптимум концентраций ЭДТА, полученных в эксперименте, находится в пределах от 0,16 до 0,2 г/л, что подтверждает наши теоретические расчеты. При таких концентрациях ЭДТА раствор оказывается кинетически устойчивым и образование осадка не наблюдается, все необходимые для питания клетки элементы находятся в растворенной форме.

**Заключение.** Таким образом, увеличение концентрации ЭДТА в среде Заррука до 0,16 - 0,2 г/л предотвращает выпадение осадка и обеспечивает более высокую, чем в контроле (на 10 – 20 %) плотность культуры на стационарной фазе роста.

1. *Бородина А. В.* Ростовые характеристики цианобактерии *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. при использовании различных источников неорганического углерода в питательных средах // Бот. исслед. в азиатской России: Матер. XI съезда РБО (18-22 августа 2003 г., Нов. - Барнаул). Т. 1. – Барнаул: Изд-во «АзБука», 2003. – с. 84.
2. *Бородина А. В.* Углеродный баланс в культуре цианобактерии *Spirulina platensis* при выращивании на различных источниках углерода // Экологии моря. - 2003. - Вып. 64. - С. 78 - 81.
3. *Васильев В. П.* Аналитическая химия. В 2 ч. Ч 1. Гравиметрический и титриметрический методы анализа: Учеб. Для химико-технол. вузов. – М.: Высш. шк., 1989. – 320 с.
4. *Лурье Ю. Ю.* Справочник по аналитической химии // Москва: Химия, 1979. – 480 с.
5. *Минюк Г. С., Тренкениу Р. П., Алисиевич А. В., Дробецкая И. В.* Влияние селена на рост *Spirulina platensis* (Nordst.) в накопительной и квазинепрерывной культурах // Экология моря. - 2000. - Вып. 54. – С. 42 - 49.
6. *Zarrouk C.* Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Stech. et Gardner) Geitler // Ph.D. thesis. - Paris, 1966. – 138 p.

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь

Получено 20.09.2005

A. V. BORODINA S. V. KAPRANOV

**UPDATING OF ZARROUK MEDIUM FOR CULTIVATION  
*SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS***

**Summary**

The theoretical chemical analysis of Zarrouk nutrient medium is lead with the purpose of finding-out of structure of a sediment dropping out at its preparation. The necessary quantity chelation, for prevention of education of a sediment is counted. Dependence of density of biomass *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler, from various contents EDTA in Zarrouk medium is shown.