

579:582.26/.27
Т663

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ОРДЕНА ЛЕНИНА СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ

На правах рукописи

УДК 582.26:581.174

Тренкеншу Рудольф Павлович

РОСТОВЫЕ И ФОТОЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
МОРСКИХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ПЛОТНОЙ КУЛЬТУРЕ

03.00.02 - биофизика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Красноярск - 1984 г.

Работа выполнена в лаборатории биофизики Института
биофизики СО АН СССР (Г.Красноярск)

Научные руководители: доктор физико-математических наук
Ф.Я.Силько
кандидат физико-математических наук
В.Н.Булянин

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
З.З.Финенко (г.Севастополь)
кандидат физико-математических наук
Н.С.Ерошин (г.Красноярск)

Ведущая организация - Кафедра биофизики биологического
факультета МГУ

Защита состоится "11" ноября 1984 г. в 14 часов на
заседании специализированного совета Д 003.45.01 при Институте
биофизики СО АН СССР по адресу: 660036, Красноярск, 36, Академ-
городок, Институт биофизики СО АН СССР

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биофизики СО АН СССР.

Автореферат разослан "7" декабря 1984 г.

Ученый секретарь
Специализированного Совета
доктор физ.-мат.наук



Н.С.Адросов

ПРОВ 2010

Актуальность темы. Для целей прогнозирования биологической продуктивности моря и повышения первичной продукции марикультуры необходимы конкретные знания зависимости роста планктонных водорослей от основных факторов среды. В силу одновременного влияния многочисленных факторов, способных ограничить рост микроводорослей в естественных условиях, трудно непосредственно выявить основной лимитирующий параметр среды. Получение четких закономерностей становится возможным при использовании культур с высокой концентрацией клеток и с непрерывным протоком среды. Для осуществления интенсивных проточных культур микроводорослей необходимо предварительно решить ряд задач по минеральному и световому обеспечению клеток и количественно определить фотоэнергетическую зависимость роста водорослей в культурах различной плотности.

Создание специальных питательных сред, обеспечивающих нелимитированный макро- и микроэлементами рост водорослей, и определение оптимальных (по свету и плотности культуры) условий является основой для оценки потенциальных ростовых, продукционных и фотоэнергетических свойств морских микроводорослей. Такая оценка, в свою очередь, позволяет прогнозировать первичную продуктивность моря и создавать искусственные производства биомассы водорослей для получения ценных органических веществ.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы - изучение ростовых, продукционных и фотоэнергетических характеристик морских микроводорослей в культуре различной плотности при периодическом и непрерывном выращивании. Исходя из этого, основными задачами данной работы являлись:

1. Экспериментальное получение плотных культур морских одноклеточных водорослей. Создание специальных питательных сред, обеспечивающих нелимитированный (биогенными элементами) рост клеток в плотной культуре.

2. Осуществление непрерывного проточного культивирования морских микроводорослей в суспензиях различной плотности и параметрическое управление их ростом и фотосинтезом в этих условиях.

3. Разработка параметрической модели светозависимого роста

Институт биологии
Южных морей АН УССР

БИБЛИОТЕКА

№ 2

морских микроводорослей и определение на её основе оптимальных (по продуктивности и КПД фотобiosинтеза) световых условий выращивания клеток.

Научная новизна.

1. Экспериментально показана принципиальная возможность интенсивного культивирования морских одноклеточных водорослей в плотной культуре; предложен состав сред, обеспечивающих рост клеток, лимитированный только световыми условиями выращивания.

2. Обнаружено, что при достаточном общем содержании микроэлементов в питательной среде удельная скорость роста водорослей в значительной мере определяется соотношением их концентраций.

3. Предложена модель светозависимого роста низших фототрофов с оптическими и статистическими параметрами, позволяющая описывать рост водорослей в зависимости от двух факторов: интенсивности света и плотности культуры (при прочих оптимальных условиях). Одним из результатов разработки модели явилось получение формулы для расчета питательных сред при плотностатном способе культивирования морских водорослей.

Практическая ценность. Практически выходом работы является разработка метода и оптимальной технологии интенсивного культивирования водорослей *Platymonas viridis* и *Porphyridium cruentum*. Эти результаты используются в практике производства корма (для молоди ценных видов беспозвоночных и рыб) и гелеобразующих веществ.

Публикации. Основное содержание работы изложено в 12 печатных работах.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на IX Всесоюзном совещании по круговороту веществ в замкнутой системе (Канев, 1976), Шестом Советско-японском симпозиуме по вопросам аквакультуры и повышения биопродуктивности Мирового океана (Батуми, 1977), III Всесоюзном совещании по научно-техническим проблемам мариккультуры (Владивосток, 1980), объединенных семинарах Дальневосточного госуниверситета, Института биологии моря ДВНЦ АН СССР, Тихоокеанского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии МРХ СССР (Владивосток, 1977, 1979).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Изложена на 170 стр. машинописного текста, включая 30 рисунков и 8 таблиц. Библиография содержит 174 наименования работ, из них 86 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава диссертационной работы посвящена обзору литературы по современным методам культивирования, влиянию элементов минерального питания на рост и фотосинтез, анализу уравнений светозависимого роста микрородорослей и постановке задачи исследований.

Культуры морских одноклеточных водорослей широко используются в науке и практике. Выращивание клеток в основном производится в экстенсивных условиях, при низких значениях плотности и скорости роста. Такие условия характеризуются небольшой продуктивностью культуры и требуют относительно больших объемов культиваторов для получения необходимых количеств биомассы водорослей. Кроме того, экстенсивные методы выращивания не обеспечивают стабильного выхода биомассы и управления процессом культивирования. Так, по данным австралийских авторов (*Wisely, Purday, 1963*), разработанный ими метод культивирования морских водорослей позволяет получать максимальную плотность водорослей за 14 - 55 суток выращивания, Укелес (*Ukelles, 1965*) использовала для выращивания ёмкости объемом 270 л, Анселл (*Ansell et al., 1968*) - 1000 л. Все авторы использовали установки открытого типа, и выход водорослей был нестабильным из-за частого заражения культур простейшими, а в отдельных случаях низкие скорости роста водорослей приводили к их полному выеданию простейшими. Установки закрытого типа разработаны в Англии (*Knowless, Edwards, 1971*). Система культиваторов, состоящая из трёх реакторов объемом 330 л каждый, позволяла получать устойчивый выход при 15 % ежедневном сливе суспензии в течение двух недель, после чего клетки претерпевали какие-то изменения и процесс становился неустойчивым.

Рассматривая современные методы культивирования морских одноклеточных водорослей в целом, видно, что получить устойчивый рост клеток с использованием этих методов трудно. Главной причиной является экстенсивный рост водорослей, который в итоге обуславливает нестабильный процесс культивирования. В то же время, используемые авторами интенсивности света потенциально позволяют получать более высокие скорости. Учитывая, что температура и pH в большинстве опытов поддерживались на оптимальном уровне, а углерод не лимитировал роста, можно заключить, что низкие скорости

обусловлены применением питательных сред, неоптимизированных по составу. Использование таких сред не позволяло авторам достичь высоких плотностей клеток, которые в опытах были намного ниже плотностей при лимитировании светом.

Таким образом, значительное повышение скоростей роста и плотностей культур в основном связано с решением вопросов минерального питания клеток, с созданием специальных питательных сред, не лимитирующих рост водорослей. Это требует подробного изучения влияния концентраций биогенных элементов на рост и фотосинтез водорослей, особенно, высоких концентраций азота, фосфора, железа и микроэлементов с учётом их возможного взаимодействия между собой и другими факторами, влияющими на метаболизм клеток.

Особенностью в изучении действия биогенных элементов на метаболизм морских водорослей является то, что морская вода содержит практически все компоненты, необходимые для нормальной жизнедеятельности клеток (Хлебович, 1974). Однако соотношение элементов в морской воде значительно отличается от потребностей водорослей в них. В результате этого некоторые компоненты полностью извлекаются из воды клетками в процессе их роста и становятся лимитирующими факторами, особенно при высоких концентрациях клеток. К таким компонентам, в первую очередь, относятся азот и фосфор, имеющие первостепенное функциональное значение для всех организмов (Вернадский, 1967). Остальные макроэлементы содержатся в морской воде в большой массе и по своему количеству не лимитируют рост водорослей. Относительно роли микроэлементов сведений мало, однако в отдельных работах отмечается линейная зависимость между продуктивностью водорослей и концентрацией некоторых микроэлементов и железа в морской воде (Орадовский, 1971).

Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению влияния азота и фосфора на рост и фотосинтез морских микроводорослей (Eppley, 1966; Thomas *et al.*, 1972; Caperon, Meyer, 1972; Atkins, 1923; Ketchum, 1939; Goldberg *et al.*, 1951; Кабанова, 1958; Финенко, Крупаткина, 1974), практически отсутствуют сведения о концентрациях этих элементов в питательных средах, обеспечивающих нелимитируемый рост водорослей в плотных культурах. В то же время данные указывают на возможность выращивания морских водорослей при высоких концентрациях биогенных элементов в среде, что является важной предпосылкой для получения плотных культур.

Важнейшим фактором, определяющим продукционные свойства культуры водорослей, является свет. Особенностью морских одноклеточных водорослей (по отношению к свету) является сильно выраженное фотоингибирование роста и фотосинтеза при высоких интенсивностях света. Такая реакция морских водорослей на интенсивность освещения требует подробного изучения световых зависимостей роста и фотосинтеза и определения оптимальных световых условий для реализации максимальных продукционных и фотоэнергетических показателей культуры.

Анализ моделей, предложенных для описания зависимости роста и фотосинтеза морских микроводорослей от интенсивности света (Steele, 1962; Vollenweider, 1962; Platt *et al.*, 1975; Jassby, Platt, 1976; Рабинович, 1953) показал, что эти модели дают удовлетворительное совпадение с полученными в экспериментах данными только на отдельных участках световой кривой. Кроме того, используемые уравнения являются эмпирическими и не включают оптических параметров культуры, что значительно затрудняет их применение для описания экспериментальных процессов с различной концентрацией клеток и для отыскания оптимальных световых условий, в которых реализуются потенциальные скорости фотосинтеза водорослей. Для описания светозависимого роста и фотосинтеза пресноводных водорослей разработан ряд уравнений, как эмпирических, так и основанных на простейших представлениях о механизме первичного преобразования световой энергии при фотосинтезе (Baly, 1935; Smith, 1936; Tamija *et al.*, 1953; Gorsby, 1961; Cnill, 1977; Baden, 1978; Bannister, 1974, 1978; Рабинович, 1953; Смирнов, 1963; Еелянин с соавт., 1977; Филипповский, 1970). Отдельные уравнения включают оптические параметры и применимы к культурам различной плотности. Однако большинство из этих уравнений также не могут быть использованы для описания световых кривых морских водорослей, так как не учитывают фотоингибирования.

В литературе имеются сведения об изучении ингибирования фотосинтеза высокими интенсивностями света. Механизм фотоингибирования предложенный Джонсом и Коком (Jones, Kok, 1964) вместе с современными представлениями о лимитировании первичных процессов фотосинтеза светом являются важной предпосылкой для разработки модели светозависимого роста и фотосинтеза морских одноклеточных водорослей.

Объекты и методы исследования описаны во второй главе. В качестве объектов исследования были выбраны три вида морских одноклеточных водорослей из коллекции Л.А. Ланской ИНБЕМ АН УССР, 1. Севастополь : зеленая флагаеллята *Platymonas viridis* Rouch. (Роухийнен, 1966); красная микроводоросль *Porphyridium cruentum* Naegeli (Lewis, Zirkle, 1920); динофлагаеллята *Gymnodinium Can-skaja* Rouch (Роухийнен, 1968). Основой для приготовления питательных сред служила морская вода, взятая из Севастопольской бухты (Черное море, $\Sigma = 17-18\%$) или из пролива Старк (Японское море, $\Sigma = 34-36\%$). В отдельных опытах использовали морскую соль.

Водоросли выращивали в колбах Эрленмейера или в реакторе из оргстекла с толщиной освещаемого слоя суспензии 4,5 мм и объемом 1 л (Ковров, Буданов, 1964). Во всех опытах суспензии непрерывно продували воздухом, обогащенным углекислым газом до 2-3 % по объему. Расход газо-воздушной смеси составлял 6-7 л/мин на 1 л суспензии, что обеспечивало стабилизацию pH культуры в диапазоне 7-8, т.е. в пределах оптимальных значений для роста изучаемых видов водорослей. Температуру поддерживали с помощью ультратермостатов.

Непрерывный процесс роста клеток обеспечивали путем дискретных сливов (через 0,5-4 ч) части суспензии и долива свежей питательной среды до первоначального объема. В зависимости от режима выращивания объем слива задавали либо постоянным (хемостат), либо изменяли в соответствии с приростом оптической плотности культуры (плотностат). В опытах стабилизировали на определенных уровнях оптическую плотность суспензии в области красного максимума поглощения хлорофилла a (ΔD_{680}), измеренного относительно D_{730} : $\Delta D_{680} = D_{680} - D_{730}$. Стабилизация величины ΔD_{680} обеспечивала постоянство концентрации хлорофилла a в суспензии (хлорофиллостат).

Энергетическую освещенность на поверхности культуры в области фотосинтеза чesки активной радиации (ФАР, 390-720 нм) измеряли пиранометром Янишевского по методике Гуляева (1963).

Основными измеряемыми показателями роста водорослей были: оптическая плотность, концентрация клеток и сухой биомассы и объемная концентрация плотного осадка клеток при центрифугировании. Концентрацию хлорофилла a определяли по методике Шлыка (1966).

Абсолютная скорость роста (продуктивность, P) по определению равна: $P = dx/dt$, где dx - прирост биомассы водорослей на единицу объема или освещаемой поверхности за время dt . На линейном участке накопительного роста можно использовать: $P = (x - x_0)/(t - t_0)$, где x, x_0 - концентрация биомассы в моменты времени t, t_0 . Понятие удельной скорости роста введено Елзманом (Blackman, 1919) и записывается: $\mu = dx/xdt$. В случае линейного роста: $\mu = \frac{x - x_0}{x_0(t - t_0)}$, где x_0 - средняя концентрация биомассы на отрезке $t - t_0$. Для области экспоненциального роста, (когда $\mu = const$), выражение для μ имеет вид: $\mu = [\ln(x/x_0)]/(t - t_0)$.

В непрерывном процессе выращивания (после установления стационарного роста) удельную скорость можно определить через отношение: $\mu = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{V_0 t}$, где $\sum_{i=1}^n V_i$ - суммарный объем сливов, n - число сливов в опыте, V_0 - объем суспензии в реакторе, t - продолжительность опыта. В этом случае продуктивность равна: $P = \mu \cdot x_{ст}$, где $x_{ст}$ - стационарная концентрация биомассы.

Коэффициент поглощения ФАР слоем суспензии рассчитывали по формуле:

$$\alpha = 1 - \frac{\sum_{\lambda=390nm}^{720nm} \epsilon_{\lambda} \tau_{\lambda}}{\sum_{\lambda=390nm}^{720nm} \epsilon_{\lambda}}$$

где ϵ_{λ} - спектральная плотность энергии источника света, τ_{λ} - спектральное пропускание суспензии (рис. 1).

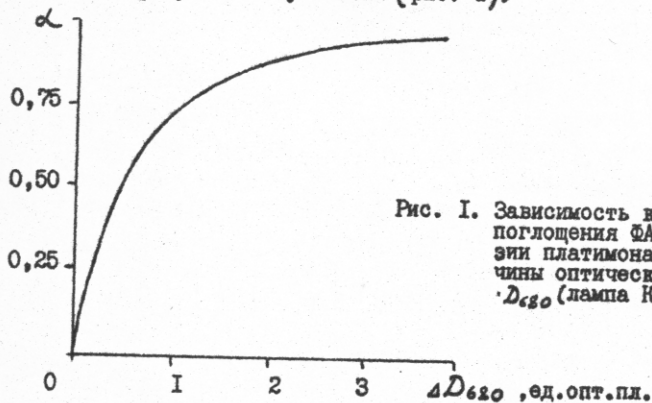


Рис. 1. Зависимость коэффициента поглощения ФАР, α , суспензии платимонасы от величины оптической плотности D_{680} (лампа КИ-220-1000-3).

При планировании экспериментов использовали метод Бокса - Уилсона (Адлер и др., 1971).

В третьей главе представлены результаты экспериментального изучения роста водорослей в различных условиях минерального обеспечения.

В наших предварительных опытах было обнаружено, что скорость роста и плотность платимонаса увеличивались, если в питательную среду наряду с повышенными концентрациями микроэлементов по рецепту Гольдберга в модификации Кабановой (1961) добавляли молибден, а концентрация железа устанавливалась достаточно высокой (табл. I).

Таблица I

Накопление биомассы за семь суток роста и содержание азота и фосфора в клетках платимонаса при различном начальном содержании этих элементов в среде

№ опытов	Концентрация элементов в питательной среде, мг/л		Концентрация сухой биомассы в культуре, г/л	Содержание элементов в конце опыта, мг/г	
	азот	фосфор		азот	фосфор
1	28	1,75	0,40	40	5,2
2	200	26,0	1,10	49	11,5
3	200	55,0	1,15	55	-
4	200	55,0	1,90	50	12,0
5	300	60,0	4,50	60	10,0
6	300	60,0	0,50	70	19,5

Примечание. Во всех опытах освещенность культуры была: сверху - 8 Вт/м^2 , снизу - 24 Вт/м^2 ФАР. Толщина слоя суспензии составляла 3 см. Повторность опытов 2-6 кратная. Опыт 1 - на среде Гольдберга в опытах 2 и 3 подавались железо, марганец, кобальт в концентрации 0,5 мг/л; в опытах 4 - 6 добавлен молибден 0,5 мг/л; в опытах 5 и 6 концентрация железа увеличена до 9,5 мг/л. Длительность опыта 6 - двое суток.

Эти данные показывают, что плотность культуры платимонаса зависит как от концентрации азота и фосфора в среде, так и от наличия микро элементов. Из опытов видно также, что потребность клеток в азоте составляет 40-70, фосфоре - 5,2-19,5 мг/г(сух.б.)/. При использованной освещенности концентрации азота 300 и фосфора 60 мг/л обеспечивают высокую скорость роста и позволяют получать плотность культуры до $4\pm 5 \text{ г(сух.б.)/л}$.

Аналогичные опыты были проведены для порфиридиума (рис. 2). Видно, что потребность порфиридиума в азоте составляет $\approx 50 \text{ мг/г(с.б.)}$, а нелимитирующая прирост биомассы концентрация азота в среде зависит от освещенности культуры и составляет ≈ 200 и 275 мг/л (для 23 и 32 Вт/м^2 ФАР, соответственно).

Рост гимнодиниума на среде Гольдберга ограничен концентра-

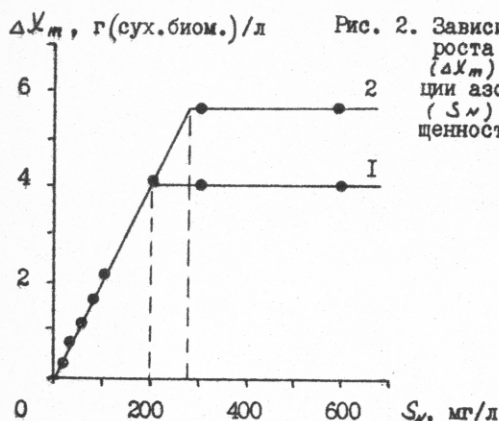


Рис. 2. Зависимость максимального прироста биомассы порфиридиума (ΔX_m) от начальной концентрации азота в питательной среде (S_n) при поверхностной освещенности культуры:

I - 23 Вт/м² ФАР,

2 - 32 Вт/м² ФАР.

цией фосфора в среде. Добавка фосфора в стационарной фазе обеспечивала соответствующий прирост клеток.

В целом проведенные эксперименты показывают, что рост водорослей определяется как концентрацией азота и фосфора в среде, так и плотностью культуры. Потребность водорослей в элементах для прироста 1 г сух. биом. составляет: платимонас - в среднем 60 мг азота и 12 мг фосфора; порфиридиум - 50 и 9+18; гимнодиниум - 40+50 и 6+9.

В опытах с накопительной культурой платимонаса было выяснено, что концентрация железа 8 мг/л обеспечивает нелимитируемый рост при высокой плотности клеток, для культур малой плотности достаточно 4 мг/л железа. Эти данные хорошо согласуются с результатами химического анализа платимонаса, который показал содержание железа в клетках I, 0+1,3 мг/г (сух. б.), т. е. концентрация железа 4 мг/л обеспечивает прирост биомассы до 3+4 г (сух. б.) / л. Для других видов получены аналогичные результаты. Так, скорость роста гимнодиниума лимитирована при концентрации ниже 1 мг/л Fe для низких плотностей ($0,2+0,4 \cdot 10^6$ кл./мл) и ниже 3 мг/л для плотных культур ($1+2 \cdot 10^6$ кл./мл) (рис. 3).

В опытах с микроэлементами использовали методы планирования экспериментов. Предварительно было установлено, что при культивировании платимонаса на среде с составом микроэлементов по прописи Гольдберга, удельная скорость роста не превышает $0,041 \text{ час}^{-1}$. При

использовании для железа, марганца, кобальта и молибдена концентраций в 5 мг/л скорость роста увеличивается до $0,061 \text{ час}^{-1}$, поэтому такая концентрация была выбрана за основной уровень. Полученные в опытах результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2

Матрица планирования и результаты опытов по определению влияния концентраций железа, марганца, кобальта и молибдена в питательной среде на удельную скорость роста (μ) платимонаса

Опыты	Концентрация элементов, мг/л				μ , час ⁻¹
	Fe	Mn	Co	Mo	
I	0,5	0,5	0,5	0,5	0,085
2	0,5	0,5	0,5	9,5	0,075
3	0,5	0,5	9,5	0,5	0,091
4	0,5	9,5	0,5	0,5	0,068
5	0,5	9,5	0,5	9,5	0,071
6	0,5	9,5	9,5	0,5	0,092
7	0,5	9,5	9,5	9,5	0,088
8	9,5	0,5	0,5	0,5	0,079
9	9,5	0,5	0,5	9,5	0,107
10	9,5	0,5	9,5	0,5	0,091
11	9,5	0,5	9,5	9,5	0,097
12	9,5	9,5	0,5	0,5	0,084
13	9,5	9,5	0,5	9,5	0,095
14	9,5	9,5	9,5	0,5	0,097
15	9,5	9,5	9,5	9,5	0,089
16	9,5	9,5	9,5	9,5	0,091
17	6,0	5,0	4,5	4,0	0,105
18	7,0	5,0	3,5	3,0	0,113
19	8,0	5,0	2,5	2,0	0,117
20	9,0	5,0	1,5	1,5	0,114
21	9,5	5,0	1,0	1,0	0,110
22	9,5	5,0	0,5	0,5	0,102

Примечание. Повторность опытов II кратная, д.л. уровня достоверности 95%, дисперсия воспроизводимости $\pm 0,003 \text{ час}^{-1}$.

Математическая обработка результатов опытов I-16 позволила получить уравнение регрессии, адекватно описывающее влияние изучаемых элементов и рассчитать программу "крутого восхождения" в область оптимальных концентраций (опыты 17-22).

В связи с тем, что ярко выраженного действия марганца на рост платимонаса в этих опытах выявлено не было (коэффициент регрессии оказался незначимым), была проведена серия дополнительных опытов, результаты которых приведены на рис. 4. Видно, что рост платимонаса определяется не только концентрацией одного из элементов, но и соответствующими концентрациями других элементов.

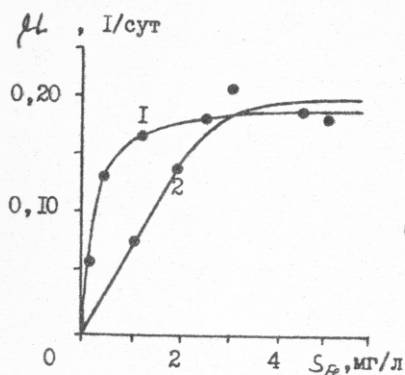


Рис. 3. Зависимость удельной скорости роста (μ) гимнодиниума от концентрации железа (S_{Fe}) в среде при плотности культуры 0,2+0,4 млн кл/мл (кривая 1), и 1+2 млн кл/мл (кривая 2).

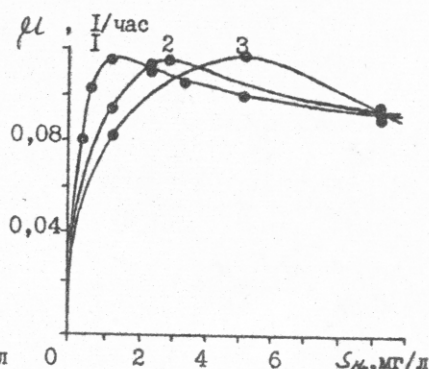


Рис. 4. Зависимость удельной скорости роста (μ) платимонаса от концентрации марганца (S_{Mn}) в среде при различных концентрациях кобальта и молибдена: 1 - 0,5 и 0,5; 2 - 1,25 и 1,0; 3 - 2,5 и 2,0 мг/л, соответственно.

Микроэлементный анализ биомассы платимонаса показал, что кроме добавляемых в питательную среду элементов, клетки накапливают относительно высокое количество хрома, титана и никеля (Грибовская и др., 1980). В опытах была обнаружена стимуляция роста платимонаса в накопительной культуре при добавках хрома и титана в среду.

Для определения оптимальных концентраций микроэлементов, обеспечивающих нелимитируемый рост водорослей в культурах различной плотности были проведены опыты по выращиванию клеток в накопительном режиме. Параметром оптимизации служила продуктивность при плотности клеток 0,5+1,5 г (сух.б.) / л и 2,0+3,0 г (сух.б.) / л. Полученные данные (табл. 3, опыты I-8), несмотря на то, что коэффициенты регрессии оказались незначимыми, позволили рассчитать программу "крупного восхождения" и определить концентрации микроэлементов, обеспечивающие наилучший рост как при низкой, так и при высокой плотности культуры (табл. 3, опыты 9-14, рис. 5).

В итоге, на основании опытных данных, предложен состав питательных сред, позволяющих получать интенсивную плотную культуру морских одноклеточных водорослей, в которых рост и концентрации клеток ограничены только интенсивностью света. Для освещенностей до 30+35 Вт/м² ФАР такой состав среды для платимонаса включает:

Таблица 3

Матрица планирования и результаты опытов по изучению влияния микроэлементов на продуктивность платимонаса в культуре низкой (P_1) и высокой (P_2) плотности клеток

Опы- ты	Концентрация элементов, мг/л						Продуктивность, г(сух.б.) / л.·сут	
	Mn	Co	Mo	Cu	Ti	Ni	P_1	P_2
I	0,25	0,125	0,10	0	0	0	0,50	0,27
2	4,75	2,375	1,90	0	0	0,5	0,37	0,37
3	0,25	0,125	0,10	0,5	0	0,5	0,43	0,20
4	4,75	2,375	1,90	0,5	0	0	0,43	0,43
5	0,25	0,125	0,10	0	0,5	0,5	0,50	0,25
6	4,75	2,375	1,90	0	0,5	0	0,43	0,60
7	0,25	0,125	0,10	0,5	0,5	0	0,60	0,50
8	4,75	2,375	1,90	0,5	0,5	0,5	0,50	0,50
9	2,00	1,00	0,80	0,25	0,25	0	0,60	0,65
10	2,50	1,25	1,00	0,30	0,35	0	0,60	0,75
11	3,00	1,50	1,20	0,35	0,45	0	0,60	0,68
12	3,50	1,75	1,40	0,40	0,55	0	0,55	0,60
13	4,00	2,00	1,60	0,45	0,65	0	0,55	0,55
14	4,50	2,25	1,80	0,50	0,75	0	0,50	0,55

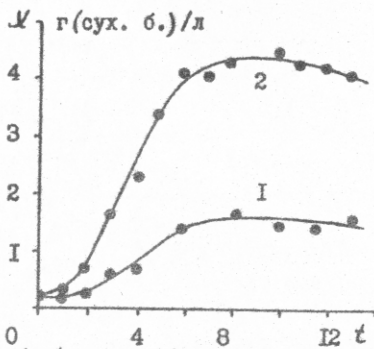


Рис. 5. Накопительные кривые платимонаса:
1 — среда Гольдберга с удвоенным количеством фосфора;
2 — в опыте 10 (табл. 3).

0 NaNO_3 -1800; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -300; $\text{Na}_2\text{ЭДТК}$ -37; $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -42;
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -8,0; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -6,25; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -1,83; TiO_2 -
0,58; $\text{KCr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ -2,38 мг на литр естественной морской воды.
Среда для порфиридиума при указанных интенсивностях света имеет
следующий состав: NaNO_3 -1200; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -450; $\text{Na}_2\text{ЭДТК}$ -37;
 $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -26,5; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -4,0; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -3,1;
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -0,9; $\text{KCr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ -1,7 мг/л. Данные среды
обеспечивают получение концентраций водорослей в культуре до 4 + 6
г(сух.биом.) / л. Для получения более плотных культур необходимо
повышение интенсивности света и пропорциональное увеличение кон-
центрации солей в питательной среде.

Четвертая глава. Количественное описание роста и фотосинтеза микроводорослей в зависимости от светового фактора.

Рассмотрим простой механизм первичного преобразования энергии в фотосинтетической системе, когда единственным лимитирующим и ингибирующим фактором является свет. Поглощение фотонов и превращение их энергии в химическую происходит в фотосинтетических единицах (ФСЕ), состоящих из пигментов-сборщиков фотонов - "антенны" и реакционного центра (РЦ) - "ловушки" (*Emerson, Arnold, 1932; Gaffron, Wokel, 1936*). При поглощении фотонов молекулы пигментов антенны ФСЕ переходят в возбужденное состояние, которое мигрирует к РЦ. Поступающий в РЦ квант энергии переводит его в возбужденное состояние. В течение времени τ_0 РЦ "перерабатывает" квант в фотосинтетический электрон и не способен принять мигрирующие с антенны кванты, энергия которых рассеивается в виде излучений и тепла (*Duysens, 1951, 1952, 1964*). Поток фотосинтетических электронов, который возникает в системе, состоящей из N_0 ФСЕ (или РЦ) ограничивается скоростью "переработки" квантов и общим количеством РЦ.

Обозначим поверхностную концентрацию возбужденных РЦ через N^* . Частота появления возбужденных РЦ под действием квантов, мигрирующих к РЦ: $\rho = N^*/N_0$. Учитывая, что кванты поступают в РЦ неравномерно, но статистически, и представляют собой стационарный пуассоновский поток, для вероятности того, что за время τ_0 в РЦ попадет хотя бы один квант можно записать: $\rho = 1 - \exp(-\bar{L}_0 \bar{i}_n \tau_0)$, где $\bar{L}_0$ - вероятность "захвата" одним невозбужденным РЦ мигрирующих квантов; $\bar{i}_n$ - поток фотонов, поглощаемых пигментами одной ФСЕ.

Для учета фотоингибирования воспользуемся механизмом, предложенным Джонсом и Коком (*Jones, Cook, 1966*). Авторы полагают, что наиболее вероятным механизмом фотоингибирования является переход РЦ в неактивное состояние при прямом попадании в них фотона, который разрушает один из компонентов РЦ. В этом случае поток фотосинтетических электронов будет определяться количеством возбужденных активных РЦ (N_a^*). Вероятность того, что за время τ_i в РЦ не попадет ни один фотон, приводящий к ингибированию (т.е. РЦ находится в активном состоянии, ρ_a): $\rho_a = \exp(-s_i \bar{i}_0 \tau_i)$, где s_i - "сечение поглощения" фотонов компонентом РЦ, переводящим РЦ в неактивное состояние; $\bar{i}_0$ - поток фотонов, действующих на компонент РЦ; τ_i - время, в течение которого фотон находится в области поглощения компонента РЦ. Вероятность того, что РЦ находится в возбужденном

активном состоянии: $\rho_a^* = N_a^*/N_0 = p \cdot p_a$. Отсюда, для стационарного режима, получаем уравнение для интенсивности потока электронов, возникающего в фотосинтезирующей системе:

$$V = \frac{N_a^*}{\tau_0} = \frac{N_0}{\tau_0} (1 - e^{-k_0 i n \tau_0}) e^{-s i c_0 \tau_0}.$$

Для использования уравнения при описании ростовых и продукционных характеристик культуры микроводорослей при различной поверхностной освещенности и плотности культуры параметры, входящие в уравнение выразим через непосредственно измеряемые величины. С учетом "темнового дыхания" культуры уравнение для продуктивности можно привести к виду:

$$P = T_0 \Delta D_{680} (1 - e^{-\frac{K_{680} I_0}{\Delta D_{680}}}) e^{-K_i I_0} - \mu_n \Delta D_{680} / \beta \phi_{680}.$$

где μ_n - удельная скорость "темнового дыхания" клеток; β - относительное содержание хлорофилла a в биомассе клеток; ϕ_{680} - сечение поглощения хлорофилла a в области 680 нм. Коэффициенты обозначают: $T_0 = \eta_m \hbar \nu_n / R \tau_0 s_0 \Delta D_{680}$; $K_0 = k_0 \tau_0 s_0 \Delta D_{680} / \hbar \nu_n$; $K_i = s i c_0 / \hbar \nu_0$, где η_m - максимальная эффективность преобразования энергии; s_0 - геометрическое сечение ФСЕ; ΔD_{680} - оптическая плотность монослоя ФСЕ; $\hbar \nu_n$ - средняя энергия поглощаемых фотонов; $\hbar \nu_0$ - средняя энергия падающих фотонов.

Основой для определения коэффициентов уравнения для платимона са послужили экспериментальные данные, полученные в непрерывном плотностатном режиме выращивания этой водоросли. Результаты эксперимента и расчетная кривая показаны на рис. 6.

Для применения уравнения к описанию световых кривых культур различной плотности необходимо найти аналитическое выражение для β как функции световых условий, в которых выращиваются клетки.

Наблюдаемое в многочисленных исследованиях уменьшение содержания пигментов в биомассе микроводорослей можно объяснить тем, что в них вместе с синтезом происходит деструктивное фотоокисление пигментов (Красновский, 1967). Схему обратимой фотодеструкции пигментов можно представить следующим образом. При поглощении дозы световой энергии пигмент переходит в фотоокисленное состояние, в котором он находится в течение некоторого времени Δt_a , после чего он либо разрушается, либо с константой $1/\Delta t_c$ переходит в основное состояние. Такая схема приводит к следующей зависимости относительного содержания пигментов в биомассе клеток (для условий непрерывного стационарного

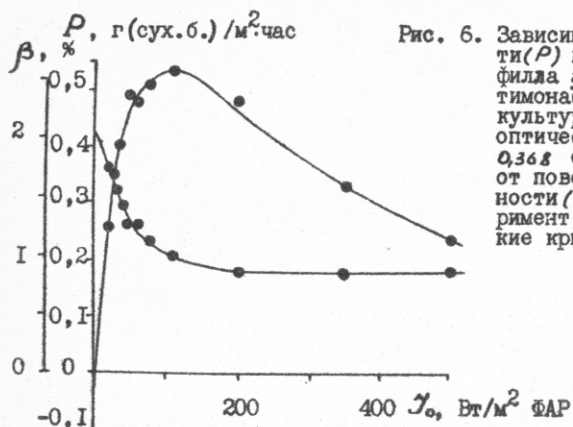


Рис. 6. Зависимость продуктивности (P) и содержание хлорофилла (β) в биомассе (β) платимонасы в непрерывной культуре при стабилизации оптической плотности $\Delta D_{680} = 0,368$ ед. опт. пл. ($\alpha = 0,395$) от поверхностной освещенности (J_0); точки - эксперимент, линии - теоретические кривые.

нарного процесса культивирования):

$$\beta = \beta_r \frac{K + \exp(-K_p \alpha^2 J_0 / \Delta D_{680}^2)}{K + 1},$$

где β_r - максимальное содержание пигментов в биомассе клеток; $K = \Delta t_a / (\Delta t_b - \Delta t_a)$; $K_p = k_p \Delta t_a \sigma_{680}^2 / 2,3 k_{p1}$; k_p - коэффициент; k_{p1} - показатель поглощения, зависящий от спектральных свойств пигмента и источника света. Полученное уравнение хорошо описывает экспериментальную зависимость (рис. 6).

В пятой главе приведены результаты экспериментального и теоретического определения условий реализации максимальных ростовых и фотознергетических показателей водорослей в культурах различной плотности.

В процессе роста водорослей в накопительной культуре концентрация биомассы увеличивается до некоторого предельного значения, определяемого лимитирующим фактором. В случае полного минерального и углеродного обеспечения максимальное накопление биомассы ограничивается поверхностной освещенностью культуры.

Максимальная плотность периодической культуры достигается в условиях равенства скоростей "чистого" фотосинтеза и дыхания. В данный момент времени культура полностью поглощает световой поток, т.е. $\alpha = 1$, а содержание пигментов близко к своему наибольшему значению: $\beta = \beta_r$. Учитывая эти условия и исходя из полученного уравнения для продуктивности, которое приравниваем нулю, можно найти максимальные значения оптической плотности, концентрации хлорофилла и

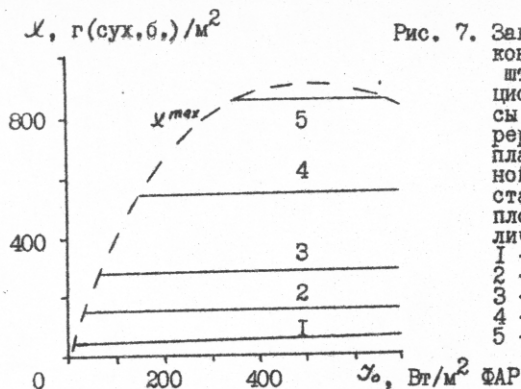


Рис. 7. Зависимость максимальной концентрации биомассы (χ^{max} , штриховая линия) и стационарных значений биомассы (сплошные линии) в непрерывной плотной культуре платимоноаса от поверхностной освещенности (J_0) при стабилизации оптической плотности ΔD_{430} на различных уровнях:
 1 - 5 ед. опт. пл.,
 2 - 20 " " "
 3 - 40 " " "
 4 - 80 " " "
 5 - 120 " " "

биомассы в зависимости от поверхностной освещенности культуры. В частности:

$$\chi^{max} = K_0 J_0 / \beta \tau C_{430} \ln \frac{\lambda_m \beta \tau}{\lambda_m \beta \tau - \mu_{\text{л}} \exp(K_i J_0)}$$

Кривая рассчитанная по этому уравнению приведена на рис. 7. Аналогичные зависимости получены для максимальных значений оптической плотности и концентрации хлорофилла a . Предельные значения этих величин наблюдаются при освещенности около 500 Вт/м² ФАР и составляют: 128+129 ед. опт. пл., 19,7+19,9 г(хл. a)/м² и 917+924 г(сух. в.) / м².

Из уравнения для относительного содержания пигментов в биомассе легко найти стационарные значения поверхностной концентрации биомассы в условиях плотностатного режима выращивания водорослей (рис. 7):

$$\chi = \frac{\Delta D_{430} (K+1) / \beta \tau C_{430}}{K + \exp(-K \rho \alpha^2 J_0 / \Delta D_{430}^2)}$$

Умножив это выражение на экономический коэффициент получим формулу расчета концентрации элементов в питательной среде для плотностата.

Как видно из рис. 6 продуктивность водорослей характеризуется максимумом при определенной интенсивности света. Взяв производную уравнения для продуктивности по интенсивности света и приравняв ее нулю, находим оптимальную освещенность как функцию стабилизируемой плотности культуры:

$$J_{\text{опт}} = \frac{\Delta D_{430} \rho}{K \alpha} \ln \frac{K \alpha + K_i \Delta D_{430}}{K_i \Delta D_{430}}$$

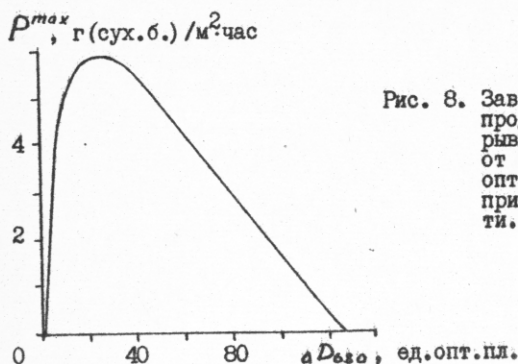


Рис. 8. Зависимость максимальной продуктивности (P^{max}) непрерывной культуры платимонаса от величины стабилизируемой оптической плотности (ΔD_{630}) при оптимальной освещенности.

Подставив найденное выражение в уравнение для продуктивности, получим зависимость максимальной продуктивности, наблюдаемой при различной плотности культуры (рис. 8). Видно, что продуктивность платимонаса имеет предельное значение, равное $5,8 \pm 5,9$ г (сух.б.) / м²·час и которая наблюдается при плотности $\Delta D_{630} \approx 25$ ед.опт.пл., что соответствует оптимальной поверхностной освещенности культуры $J_{opt} \approx 400$ Вт/м² ФАР. Для реализации такой продуктивности необходимы (при толщине освещаемого слоя 30 мм) следующие концентрации элементов в питательной среде: азот - 420, фосфор - 72, железо - 7,8 мг/л.

Семейство теоретических кривых для КПД фотобиосинтеза платимонаса представлено на рис. 9. При расчете кривых считали калорийность биомассы независимой от интенсивности света и плотности культуры и равной 4,8 ккал/г (сух.б.). Предельные величины КПД достигли

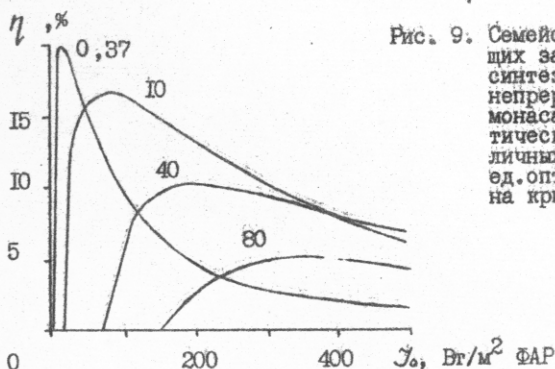


Рис. 9. Семейство кривых, описывающих зависимость КПД фотобиосинтеза (η) от освещенности непрерывной культуры платимонаса при стабилизации оптической плотности на различных уровнях (величины ΔD_{630} ед.опт.пл., указаны цифрами на кривых).

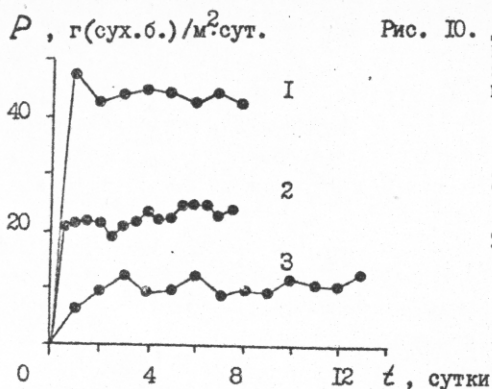


Рис. 10. Динамика продуктивности платимоны при использовании различных источников света:

- 1 - красные люминесцентные лампы ($J_0 = 55 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$),
- 2 - люминесцентные ЛДЦ 40-4 ($J_0 = 24 + 8 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$),
- 3 - накаливания КИ-220-1000-4 ($J_0 = 16 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$).

ются в области низких значений интенсивности света и плотности культуры и могут превышать 20 %. С увеличением плотности максимум КПД уменьшается и сдвигается в сторону высоких интенсивностей света.

С целью количественной оценки роста платимоны в плотной культуре и устойчивости непрерывного процесса выращивания были проведены опыты с использованием различных режимов культивирования, источников света разного спектрального состава и интенсивности действующего света. Некоторые результаты, полученные в этих опытах, показаны на рис. 10. Видно, что реализован устойчивый процесс роста клеток, и продуктивность в основном определяется интенсивностью света. Однако, сравнивая значения продуктивности, полученные на различных источниках света, легко заметить непропорциональное изменение продуктивности с варьированием облученности клеток. Это указывает на зависимость продуктивности также от спектрального состава света и хорошо иллюстрируется величинами КПД фотобисинтеза, полученными в опытах. Для ламп накаливания эти величины составили 14,5 % ($J_0 = 16 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$) и 14,8 % ($J_0 = 48 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$), дневного света - 16,5 % ($J_0 = 24 + 8 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$), красного света - 18,5 % ($J_0 = 55 \text{ Вт/м}^2 \text{ ФАР}$).

Важным аспектом выращивания водорослей является возможность направленного изменения биохимического состава клеток с помощью варьирования внешних факторов. Опыты показали, что увеличение интенсивности действующего света приводит к существенному сдвигу в скоростях синтеза отдельных биохимических составляющих биомассы. Так, содержание белка может изменяться от 7 до 50 %, углеводов от 13 до 75 %, жиров от 5 до 26 %.

ВЫВОДЫ

1. На примере трех видов микроводорослей из разных систематических отделов (*Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Pyrrhophyta*) экспериментально показана возможность периодического и непрерывного выращивания морских одноклеточных водорослей в интенсивных культурах различной плотности.

2. Разработаны оптимальные питательные среды, обеспечивающие нелимитируемый (биогенами) рост водорослей с максимальной скоростью, определяемой заданными световыми условиями. Обнаружено, что при необходимом общем количестве микроэлементов в питательной среде скорость роста водорослей в значительной мере зависит от соотношения концентраций микроэлементов.

3. Исходя из кинетики захвата и преобразования квантов поглощенного света реакционными центрами фотосинтеза и вероятностного механизма фотоповреждения реакционных центров, выведено параметрическое уравнение светозависимого роста низших фототрофов с сильно выраженным процессом фотоингибирования. В системе с ним предложено уравнение для световой зависимости стационарного содержания пигментов в биомассе водорослей, полученное на основе представления об обратимой фотодеструкции пигментов. Для примененных в работе видов водорослей, источников света и условий культивирования идентифицированы отдельные коэффициенты в уравнениях, которые затем объединены в несколько физиологических и внешних параметров. Разработанная модель позволяет с достаточной точностью рассчитывать и описывать реальные процессы культивирования морских микроводорослей по световому фактору и определить потенциальные скорости и КПД фотобiosинтеза клеток.

4. Определена количественная зависимость основных показателей роста водорослей от плотности и освещенности культуры. Найдены предельные значения оптической плотности, концентрации хлорофилла a и сухой биомассы периодических культур. Для платимонасы предельная продуктивность в непрерывном процессе выращивания составляет $5,8 \pm 5,9$ г (сух. биом.) / м² час при 400 Вт/м² ФАР. Наибольшие значения энергетического КПД фотобiosинтеза наблюдаются при низких величинах плотности (до 1 ± 2 ед. оп. пл.) и освещенности (10 ± 50 Вт/м² ФАР) для платимонасы и могут достигать 20 %.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н., Грибовская И.В. 1976. Рост и продуктивность водоросли *Platymonas viridis* в периодической культуре. - В кн.: Материалы IX Всесоюзного рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев, "Наукова думка", с. 135 - 137.
2. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Фуряев Е.А., Ярунцов С.А. 1977. Ростовые и продукционные показатели водоросли *Porphyridium cruentum* в плотных культурах. - В кн.: Интенсивная светокультура растений. Красноярск, с. 191 - 200.
3. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. 1977. Влияние микроэлементов на рост и продуктивность морской водоросли *Platymonas viridis*. - Микробиологический ж., т.39, № 4, с. 488.
4. Силкин В.А., Белянин В.Н., Тренкеншу Р.П. 1978. Рост одноклеточных водорослей в условиях светового лимитирования. - В кн.: Материалы шестого советско-японского симпозиума по вопросам аквакультуры и повышения биопродуктивности Мирового океана. М., ВНИРО, с. 199 - 203.
5. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. 1979. Светолимитируемая культура морских одноклеточных водорослей. - В кн.: Роль низших организмов в круговороте веществ в замкнутых экологических системах. Киев, "Наукова думка", с. 169 - 171.
6. Терсков И.А., Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. 1979. Светозависимый рост водоросли *Platymonas viridis*. - Изв. СО АН СССР, сер. биол., № 10, вып. 2, с. 103 - 108.
7. Белянин В.Н., Тренкеншу Р.П., Силкин В.А. 1979. Рост водоросли *Platymonas viridis* в опытах по оптимизации микроэлементного состава среды. - Биология моря, № 4, с. 14 - 19.
8. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. 1979. Влияние элементов микроэлементного питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis*. - Биология моря, № 51, с. 41 - 46.
9. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. 1980. О влиянии соотношений концентрации марганца и других микроэлементов на рост морской микроводоросли. - В кн.: Параметрическое управление биосинтезом микроводорослей, Новосибирск, "Наука", с. 5 - 8.

Ю. Толькова Н.А., Тренкеншу Р.П., Филимонов В.С. 1980. Рост динофлагелляты *Gymnodinium lankaja* на синтетической среде. - В кн.: Параметрическое управление биосинтезом микроводорослей. Новосибирск, "Наука", с. 13 - 21.

II. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. 1981. Плотные культуры морских микроводорослей. - Изв. СО АН СССР, сер. биол., № 5, вып. I, с. 75 - 82.

12. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н., Сидько Ф.Я. 1981. Модель светозависимого роста морских микроводорослей (с учетом фотоингибирования). - Препринт ИФ СО - ИББ, Красноярск, 62 с.