

УДК (581.19:582.263):001.891

В. Д. Романенко, Н. И. Кирпенко, И. Н. Коновец,
Ю. Г. Крот

**ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РОСТА
ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ ПРИ ДОПОЛНИТЕЛЬНОМ
УГЛЕРОДНОМ ПИТАНИИ. СООБЩЕНИЕ 2. РОСТ
CHLORELLA VULGARIS VEIJER. ШТАММ ЛАРГ-3
ПРИ УТИЛИЗАЦИИ CO₂ В ЗАКРЫТОЙ
КУЛЬТИВАЦИОННОЙ СИСТЕМЕ**

При выращивании культуры *Chlorella vulgaris* Beijer. (штамм ЛАРГ-3, НРДР-120) в закрытой системе при насыщении среды CO₂ установлено, что на начальных этапах культивирования избыток углекислого газа неблагоприятно воздействует на функциональную активность водоросли и вызывает изменение морфологических характеристик. Однако этот эффект исчезает в процессе ее адаптации к данным условиям и является обратимым при снижении уровня нагрузки CO₂ в системе.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, углекислый газ, скорость роста, закрытая система.

Одной из актуальных задач при создании автономных систем жизнеобеспечения является разработка методов утилизации углекислого газа. Значительный интерес в этом плане представляет использование микроводорослей. Согласно литературным данным, при оптимизации условий выращивания хлореллы ее продуктивность может достигать 10—11 л O₂/дм³·сут, а количество потребленного углерода CO₂ — до 0,49 г/г [2].

При изучении ростовых характеристик ряда зеленых хлорококковых и вольвоксовых водорослей под влиянием CO₂ ранее нами было установлено, что дополнительное углеродное питание существенно увеличивает интенсивность роста представителей рр. *Chlorella* и *Desmodesmus* в реакторах открытого типа [5]. Анализ динамики изменений интенсивности роста этих видов показал, что наиболее высоким адаптационным потенциалом обладает штамм *Chlorella vulgaris* ЛАРГ-3, который после определенного периода адаптации значительно превосходит другие исследованные водоросли. В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение возможности применения этого штамма для максимальной утилизации углекислого газа в реакторах закрытого типа.

© Романенко В. Д., Кирпенко Н. И., Коновец И. Н., Крот Ю. Г., 2010

Материал и методика исследований. Для изучения влияния высокой нагрузки CO_2 на функциональную активность водоросли *Chlorella vulgaris* Beijer. (штамм ЛАРГ-3, НРДР-120) в закрытом реакторе использовали среду А-5м [6]. На первом этапе культуру, взятую на логарифмической фазе, выращивали в одно-литровых реакторах (объем суспензии $0,45 \text{ дм}^3$), герметично закрытых эластичными резиновыми баллонами, под которые одноразово подавали фиксированный объем (1 и 2 дм^3) углекислого газа. Соотношение объемов поданного CO_2 и суспензии составило соответственно 2:1 (вариант 1) и 4:1 (вариант 2). В контрольных вариантах использовали воздух. Температура среды составляла $33 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенность 5,5 клк. В конце опыта (5—7-е сутки) определяли численность и сухую массу водорослей, концентрацию растворенного кислорода в суспензии, а также интенсивность фотосинтеза культур [3].

В дальнейшем был изучен рост *Chlorella vulgaris* при избыточном насыщении среды CO_2 . Реактор объемом 5 дм^3 наполовину заполняли суспензией водорослей на логарифмической стадии роста. Перемешивание суспензии осуществляли при помощи магнитной мешалки. Температура культивирования составляла $32 \pm 1^\circ\text{C}$, круглосуточная освещенность 25 клк. Углекислый газ подавали в реактор до прекращения поглощения его питательной средой. При этом общее количество CO_2 , поданного в систему, составило 20 дм^3 , а отношение объемов поданного CO_2 и суспензии — 8:1 (вариант 3).

В процессе эксперимента фиксировали количественные и функциональные показатели *C. vulgaris*, измеряли концентрацию CO_2 , температуру и величину рН в суспензии. Экспозиция составляла 52 ч, после чего систему разгерметизировали. Итоговые показатели роста водорослей определяли через 24 ч после разгерметизации.

Удельную скорость роста рассчитывали по формуле

$$\mu = \frac{N_{t_1} - N_{t_2}}{N_{t_1} \cdot \Delta t},$$

коэффициент прироста численности

$$k = \frac{N_0 - N_t}{N_0},$$

где N_0 — исходное количество клеток; N_t — количество клеток в момент времени t ; Δt — промежуток времени между измерениями, ч.

Результаты исследований и их обсуждение

В условиях фиксированной подачи углекислого газа (2:1 и 4:1) в течение 3 ч средой было поглощено около половины его объема, а через сутки экспозиции зафиксировано уменьшение объема газовой фазы до 10—30% от исходного, что свидетельствует об интенсивном поглощении CO_2 . При этом в

контрольных реакторах объем газовой фазы не изменялся. Величина рН в опытных вариантах снизилась с 7,40 до 5,86, что свидетельствует о преобладании в культуральной среде свободной формы углекислоты. Пресноводные водоросли способны поглощать углекислый газ как в свободном виде, так и в форме карбонатных и гидрокарбонатных ионов, однако, по мнению некоторых исследователей [8], для хлореллы более предпочтительна именно свободная углекислота.

В наших экспериментах динамика показателей роста *C. vulgaris* в течение первых 3 сут в опытных реакторах практически не отличалась от контроля. Однако с четвертых суток рост водоросли усилился, и через неделю экспозиции численность клеток превышала контрольные показатели более чем в 2 раза (табл. 1). При этом коэффициент прироста численности в первом и втором вариантах опыта достиг величин 13,3 и 19,2 соответственно, в то время как контрольные значения составляли 5,0—5,7.

Функциональная активность *C. vulgaris* по показателям интенсивности фотосинтеза также была выше в опытных вариантах (см. табл. 1), что свидетельствует о более высоком продукционном потенциале системы. Однако в реакторах с большим объемом CO_2 (2 дм^3) интенсивность фотосинтеза была несколько ниже, что дает основание предположить, что такое количество CO_2 находится на границе оптимальных величин.

Для проверки этого предположения в следующем опыте углекислый газ подавали в реактор до прекращения его поглощения питательной средой, при этом объем растворенной углекислоты в 8 раз превысил объем суспензии (вариант 3). Экспозиция *C. vulgaris* в этих условиях не сопровождалась заметным изменением численности клеток (табл. 2).

Максимальное насыщение среды CO_2 привело к резкому снижению величины рН до 5,45 и подавлению фотосинтеза водоросли. Восстановление уровня рН происходило крайне медленно, за двое суток достигнув лишь значения 5,61. Согласно полученным данным, через 5 ч экспозиции при концентрации углекислого газа 27 мг-экв $\text{CO}_2/\text{дм}^3$ фотосинтез культуры снизился в 3 раза, что свидетельствует об угнетении физиологического состояния водоросли. Только через сутки было отмечено постепенное восстановление потенциальной фотосинтетической активности культуры, и через 52 ч экспозиции уровень фотосинтеза уже превышал исходный, что привело к увеличению насыщения среды кислородом.

Сопоставление этих изменений (повышение фотосинтетической активности, возрастание концентрации растворенного кислорода, увеличение уровня рН, косвенно свидетельствующее об уменьшении количества растворенной углекислоты) позволяет предположить, что водоросли ассимилировали углекислый газ, однако это не сопровождалось увеличением их численности.

Об ухудшении условий роста водорослей свидетельствует также повышение степени агрегированности культур. Увеличение концентрации угле-

1. Показатели функциональной активности *Chlorella vulgaris* при выращивании в закрытых реакторах с подачей CO₂

Экспозиция, ч	Численность клеток, ×10 ⁴ кл/см ³	Биомасса, г/дм ³	Концентрация O ₂ в культивационной среде, мг O ₂ /дм ³	Интенсивность фотосинтеза, мг O ₂ /дм ³ ·ч
0	15,5	×	×	×
Контроль				
96	92,5	0,098	9,39	0,57
148	127,5	0,117	9,23	0,69
Вариант 1				
96	148,0	0,108	14,88	0,57
148	222,5	0,123	8,83	1,09
Вариант 2				
96	170,7	0,103	11,22	0,53
148	313,5	0,147	9,51	0,75

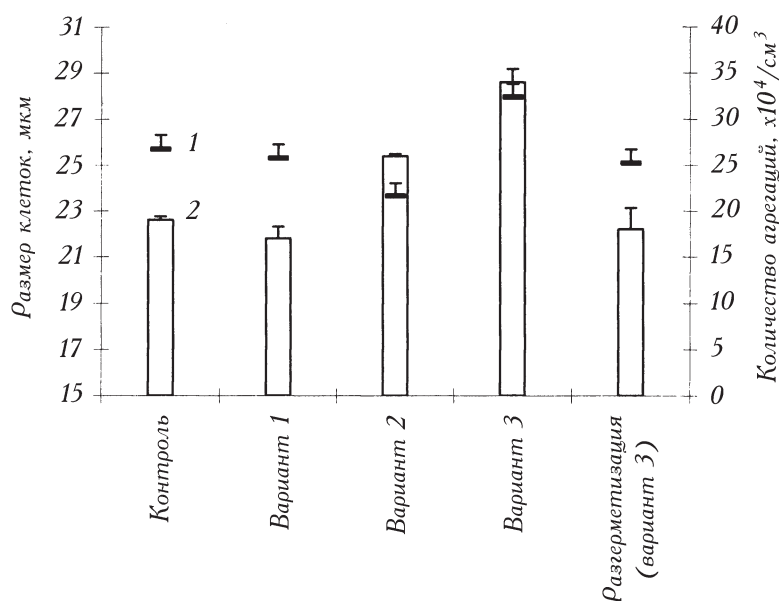
Примечание. Здесь и в табл. 2: «×» — не определяли.

2. Функциональные показатели *Chlorella vulgaris* при максимальном насыщении среды CO₂ (вариант 3)

Экспозиция, ч	Численность клеток, ×10 ⁴ кл/см ³	Концентрация кислорода в среде, мг O ₂ /дм ³	Интенсивность фотосинтеза, мг O ₂ /дм ³ ·ч
0	114,5 ± 10,1	9,5	2,08
3	135,4 ± 4,2	4,1	1,85
5	107,5 ± 1,1	4,0	0,68
24	112,3 ± 13,8	×	×
29	94,3 ± 18,8	5,8	1,35
48	111,8 ± 12,6	×	×
52	119,3 ± 21,4	7,7	2,54
Разгерметизация реактора			
72	508,5 ± 59,7	×	×
75	630,4 ± 56,6	16,1	2,46

кислоты сопровождалось сгусткообразованием, слипанием клеток, образованием псевдоколоний (рис. 1).

Повышение концентрации CO₂ в среде сопровождалось также изменением морфологических характеристик клеток водорослей. Так, через сутки экспозиции наблюдалось большое количество крупных клеток, у которых, очевидно, был заторможен процесс деления.



1. Морфологические характеристики культуры *Chlorella vulgaris* при дополнительной нагрузке CO_2 : 1 — количество агрегаций; 2 — размер клеток.

Увеличение размеров клеток в начальный период насыщения среды CO_2 было отмечено нами и в опытах с *Desmodesmus communis*, *D. armatus*, *Selenastrum gracile*, а также с другим штаммом *Chlorella vulgaris*. У десмодесмуса и селенаструма клетки увеличивались в 2—3 раза, при этом на фоне замедления деления наблюдалось нарушение расхождения молодых клеток. Однако в дальнейшем этот эффект ослабевал, морфологические характеристики водорослей возвращались к норме. Вследствие повышения относительной доли молодых клеток средняя масса клеток в опытных вариантах была ниже, чем в контроле на $(0,5—1,3) \cdot 10^{-7}$ мг.

По всей видимости, увеличение размеров клеток может быть связано с накоплением в них крахмала. Как было показано на высших растениях, активация синтеза крахмала в процессе фотосинтетического метаболизма углерода является специфической реакцией клеток на высокие концентрации CO_2 [4].

Взаимосвязь процессов деления клеток и ассимиляции углекислого газа не вызывает сомнения. На синхронной культуре *Chlorella pyrenoidosa* (при продувке воздухом с концентрацией $^{14}\text{CO}_2$ 15%) было показано, что наиболее интенсивно CO_2 фиксируется на стадии завершения процесса деления материнских клеток и начала выхода автоспор, то есть в наиболее зрелых, делящихся клетках [1]. Более интенсивная фиксация углерода при замедлении деления клеток также показана для *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyta) [7].

После разгерметизации реактора содержание CO_2 в культуральной среде, вследствие выхода значительной его части из системы, составило $6,5 \text{ мг-экв/дм}^3$, при этом величина рН возросла до $6,65$. Изменение условий вызвало вспышку размножения водорослей. За сутки численность клеток, составлявшая около 1 млн. кл/см^3 , возросла почти в 5 раз (удельная скорость роста составила $0,16 \text{ ч}^{-1}$) и в дальнейшем продолжала увеличиваться (см. табл. 2). При этом кон-

центрация растворенного кислорода составила 16 мг/дм^3 , что свидетельствует о высокой фотосинтетической активности культуры. Это сопровождалось повышением относительной доли молодых клеток, в связи с этим средняя масса клеток уменьшилась на $10,2\%$. Количество агрегаций также существенно уменьшилось (см. рис. 1).

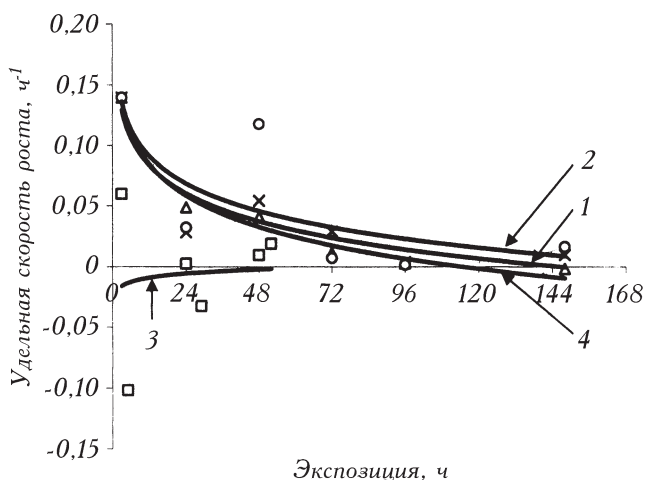
Таким образом, наблюдаемое в наших экспериментах замедление деления клеток является ответной реакцией водорослей на увеличение концентрации CO_2 в культивационной среде. В то же время дальнейшее восстановление темпов роста хлореллы подтверждает наличие у нее механизмов, позволяющих адаптироваться к высокому содержанию углекислоты. Это доказывает также тот факт, что в конце эксперимента размеры клеток в опытных вариантах достоверно не отличались от контрольных.

Анализ всего массива полученных данных свидетельствует о том, что дополнительное углеродное питание способствует значительному увеличению продукционных характеристик *Chlorella vulgaris* при выращивании в закрытых реакторах, однако этот эффект в значительной степени зависит от уровня нагрузки CO_2 (рис. 2).

Умеренная нагрузка CO_2 приводит к увеличению удельной скорости роста культуры *C. vulgaris* ЛАРГ-3. В то же время перенасыщение среды углекислым газом ингибирует функциональную активность водоросли.

Заключение

Изучение видоспецифических особенностей роста зеленых водорослей при дополнительном углеродном питании в реакторах открытого и закрытого типа



2. Продукционные характеристики *Chlorella vulgaris* в закрытой системе при разных уровнях нагрузки CO_2 : 1 — соотношение объемов CO_2 и среды 2:1; 2 — 4:1; 3 — 8:1; 4 — контроль.

показало, что дополнительная подача CO_2 сопровождается значительным усилением их роста, однако этот процесс характеризуется определенными физиологическими и биотехнологическими особенностями.

Особое значение в процессах утилизации углекислого газа имеет сбалансированность и буферная емкость питательной среды. Использование сред Фитцджеральда и Тамия, разработанных изначально для экстенсивного культивирования водорослей, сопровождалось отрицательным эффектом при дополнительной нагрузке CO_2 . В то же время при использовании в данных условиях среды АА-8 и модифицированной В. Упитисом среды А-5 отмечен существенный положительный эффект. Однако среда АА-8 не имеет достаточного количества биогенных элементов, что требует возобновления исходной концентрации компонентов минерального питания, которого можно достичь при дискретном или проточном режиме культивирования.

Изменение морфологических характеристик водорослей и разбалансировка процессов их деления и роста в начальные сроки культивирования свидетельствует о необходимости определенного периода адаптации, длительность которого в наших исследованиях составляла около 4 сут. Данная проблема может быть решена путем предварительной подготовки культуры либо разработки специального режима подачи CO_2 в реактор, при котором можно достичь положительной корреляции между интенсивностью роста водорослей и количеством углекислоты. При этом большое внимание необходимо уделять подбору видов и штаммов водорослей, поскольку им свойственна достаточно высокая видоспецифичность отклика на повышенную концентрацию CO_2 .

**

*Встановлено, що додаткове введення вуглекислого газу у культуральне середовище *Chlorella vulgaris* Beijer. (штамм ЛАРГ-3, HPDP-120) стимулює функціональну активність водорості. Надлишок вільної вуглекислоти спричинює зміни морфологічних характеристик та гальмування поділу клітин у культурі на початку експозиції. Проте цей ефект є оборотним, залежить від концентрації CO_2 у середовищі і зникає за попередньої адаптації водоростей.*

**

*Addition of carbon dioxide to media under cultivation of *Chlorella vulgaris* Beijer. (strain LARG-3, HPDP-120) stimulated functional activity of the alga. Excess in carbon dioxide quantity caused morphological alterations and inhibition of cell division at the beginning of exposition. Nevertheless these effects were found to be reversible and depended from dissolved CO_2 concentration and could be decreased by the preliminary adaptation of alga.*

**

1. Доман Н.Г., Школьник Р.Я., Спекторов К.С. Продукты фотосинтетической ассимиляции $^{14}\text{CO}_2$ синхронной культурой *Chlorella pyrenoidosa* на разных стадиях ее развития // Тр. МОИП. — 1966. — Т. 24. — С. 68—80.
2. Мелешко Г.И., Лебедева Е.К., Антонян А.А., Сигоренко Л.А. *Chlamydomonas reinhardtii* 499 в интенсивной культуре // Эксперим. альгология. — Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1977. — С. 47—67.

3. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидро-биологической практике.* — Киев: Наук. думка, 1975. — 256 с.
4. *Мокронос А.Т.* Взаимосвязь фотосинтеза и функций роста // Фотосинтез и продукционный процесс. — М.: Наука, 1988. — С. 109—121.
5. *Романенко В.Д., Кирпенко Н.И., Коновец И.Н., Крот Ю.Г.* Видоспецифические особенности роста зеленых водорослей при дополнительном углеродном питании. Сообщение 1. Скорость роста зеленых водорослей при максимальном насыщении среды CO₂ в открытой культивационной системе // Гидробиол. журн. — 2010. — Т. 46, № 1. — С. 62—74.
6. *Упит В.В.* Микроэлементы в минеральном питании хлореллы: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Киев, 1979. — 40 с.
7. *Fawley M.W.* Effects of light intensity and temperature interactions on growth characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) // J. Phycol. — 1984. — Vol. 20, N 1. — P. 67—72.
8. *Vekl K.A., Colman B., Sposato L.M.* Mechanism of inorganic carbon uptake in *Chlorella saccharophila*: The lack of involvement of carbonic anhydrase // J. Exp. Bot. — 1990. — Vol. 41, N 232. — P. 1385—1391.

Институт гидробиологии НАН Украины, Киев

Поступила 30.11.09