

УДК 582.232

С.Ю. ГОРБУНОВА, А.Б. БОРОВКОВ, Р.П. ТРЕНКЕНШУ

Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины,  
пр. Нахимова, 2, 99011 Севастополь, Украина,  
e-mail: svetlana\_8423@mail.ru, spirit2000@ua.fm, trenkens@yandex.ru

### **ПРОДУКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ *ARTHROSPIRA PLATENSIS* (NORDST.) GEITLER (*ЦАНОПРОКАРЫОТА*) ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ МИНЕРАЛЬНЫМ ФОСФОРОМ**

Приведены результаты изучения кинетики роста и потребления азота и фосфора прокариотической микроводорослью *Arthrospira platensis*, а также количественной оценки потребления культурой минеральных форм азота и фосфора в зависимости от начальной концентрации биогенных элементов в среде.

Ключевые слова: *Arthrospira platensis*, биогенные элементы, продуктивность.

#### **Введение**

Гидробиологические исследования показали существенную роль микроводорослей в формировании качества воды, пригодной для потребления (Pilon-Smits, 2005). Микроводоросли обогащают водную среду кислородом, способствуя ускорению окислительных процессов и минерализации органических примесей в сточных водах. Они способны потреблять не только минеральные вещества, но и простые органические соединения, присутствующие в стоках. Особенно активно микроводоросли поглощают ионы азота, фосфора и других биогенных элементов (Левич и др., 1986; Артюхова, 1988).

На потребление клетками элементов минерального питания могут влиять: доступность этих элементов в среде, освещенность, температура и кислотность среды, физиологическое состояние водорослей, плотность культуры, наличие внутриклеточных запасов питательных веществ, присутствие бактерий, конкурирующих видов водорослей.

Активный рост культур микроводорослей и поглощение ими биогенных элементов в лабораторных условиях обеспечивается специально подобранным или рассчитанным сбалансированным составом используемых питательных сред. Сбалансированное минеральное питание микроводорослей сложнее обеспечить при использовании в качестве питательных сред растворов сложного и неопределённого состава, морской, минеральных и сточных вод, содержащих определённое количество макро- и микроэлементов.

Благодаря способности микроводорослей к значительному накоплению в клетках ряда элементов (необходимых и сопутствующих) их используют в системах биологической очистки промышленных стоков для ассимиляции и извлечения элементов из растворов (Упитис, 1983). Пер-

© С.Ю. Горбунова, А.Б. Боровков, Р.П. Тренкеншу, 2011

спективы практического применения микроводорослей, в частности *Arthrospira platensis* — источника целого ряда биологически ценных веществ требуют решения ряда проблем при их массовом культивировании (Упитис, 1983). Последнее может осуществляться накопительным или непрерывным методом.

В научно-исследовательских и производственных целях обычно применяют периодическую культуру водорослей в связи с простотой и небольшой трудоемкостью её организации. При накопительном режиме культивирования рост водных фототрофов происходит до некоторого максимального значения, которое может быть ограничено рядом факторов: истощением питательного субстрата, интенсивностью света, подавлением продуктами обмена веществ, другими физико-химическими условиями среды. Поэтому этот метод нерационально применять в практике очистки сточных вод (Колесников, 2005).

Менее распространенный непрерывный метод культивирования обладает рядом ценных особенностей: возможностью стабилизировать все характеристики культуры, высокой воспроизводимостью результатов с любой заданной точностью, простым математическим аппаратом расчета протекающих процессов по сравнению с таковым периодической культуры. Непрерывный метод позволяет поддерживать монокультуру альгологически чистой в нестерильных условиях производства. Он наиболее эффективен в условиях управляемой культуры микроводорослей, поскольку в этом случае среда постоянно пополняется питательными элементами и освобождается от продуктов метаболизма клеток. Варьируя объём слива/долива среды (обмен) и интервал времени между процедурой обмена, можно управлять скоростью потока среды и поддерживать плотность и продукцию культуры микроводорослей на заданном уровне (Тренкеншу, 2005б).

В данной работе нам предстояло определить зависимость продуктивности непрерывной культуры *A. platensis* от уровня обеспеченности минеральным питанием.

## Материалы и методы

Объектом исследования служила прокариотическая микроводоросль *Arthrospira platensis* (штамм IBSS-31) из коллекции культур ИнБЮМ НАНУ.

Эксперимент проводили в два этапа в шести вариантах (далее варианты *A, B, C, D, E, F*) с различной концентрацией фосфора в форме фосфатов ( $P-PO_4$ ) в питательной среде: 100, 60, 30, 25, 15, 10 мг  $P \cdot л^{-1}$ . *Arthrospira platensis* выращивали на модифицированной питательной среде Заррука (Contribution ..., 1966) методом накопительных и квазинепрерывных культур. Модификация заключалась в изменении навески  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  для шести вариантов питательных сред: *A* — 0,735 г·л<sup>-1</sup>, *B* — 0,441, *C* — 0,2205, *D* — 0,1837, *E* — 0,1102 и *F* — 0,0735 г·л<sup>-1</sup>.

Для выращивания *A. platensis* использовали культиваторы плоскопараллельного типа из стекла объёмом 2 л, 43 × 22 × 3 см, в условиях

круглосуточного освещения. В качестве источника света использовали систему ламп ЛД-40. Освещённость на поверхности культур составляла в среднем  $40 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$  ( $\approx 46 \text{ ммоль фотонов}\cdot\text{с}^{-1}\cdot\text{м}^{-2}$ ). Температуру суспензии поддерживали в диапазоне  $27\text{--}32 \text{ }^\circ\text{C}$ . Объём среды в каждом культиваторе составлял 2 л. Испарение воды с поверхности компенсировали добавлением дистиллированной воды. Суспензию микроводорослей непрерывно барботировали с помощью аквариумного компрессора «Махита» производительностью  $4,8 \text{ л}\cdot\text{мин}^{-1}$ .

Отбор проб для определения плотности культуры и содержания биогенов проводили ежедневно. Прирост биомассы измеряли по изменению оптической плотности суспензии на СФ-2000 на длине волны 750 нм. Переход от единиц оптической плотности ( $D_{750}$ ) к величине абсолютно сухой массы (АСМ) осуществляли посредством эмпирического коэффициента  $k = 0,624 \pm 0,049 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1} \text{ ед. опт. пл.}^{-1}$ ,  $\text{АСМ} = k \times D_{750}$ . Продуктивность и потребности в биогенах непрерывной и накопительной культур рассчитывали по С.Ю. Горбуновой (2010). Концентрацию нитратов в растворе определяли потенциометрическим методом на иономере И-160М с помощью ионоселективного электрода ЭЛИС-121NO<sub>3</sub>, концентрацию фосфора – методом Морфи-Райли (Методы ..., 1988), рН среды измеряли с помощью рН-метра 150 М.

## Результаты

На начальном этапе эксперимента микроводоросли выращивали накопительным методом. В каждый культиватор вносили инокулят и питательную среду в такой пропорции, чтобы начальная плотность культуры во всех культиваторах была одинаковой ( $D_{750} = 0,045$ ). Во всех вариантах опыта рост культуры *A. platensis* на накопительном этапе имел типичную S-образную форму (рис. 1). Начальная плотность составляла около  $0,023 \text{ г АСМ}\cdot\text{л}^{-1}$ .

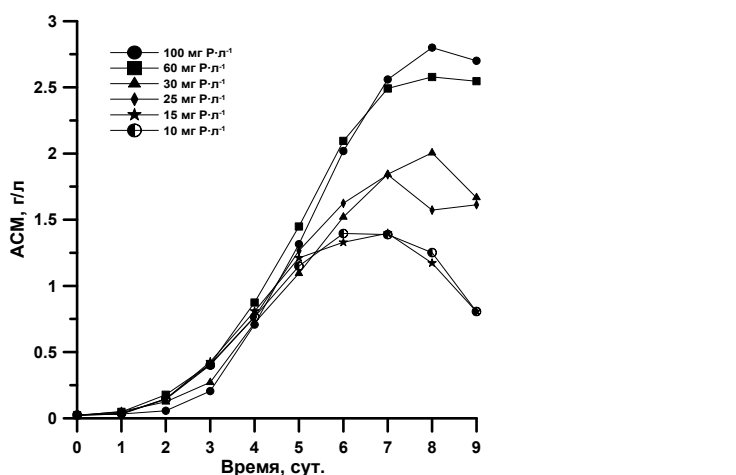


Рис. 1. Динамика плотности накопительной культуры *Arthrospira platensis* при различных концентрациях фосфора в культуральной среде (Горбунова, 2010)

С 1-х по 3-и сутки эксперимента культура находилась на экспоненциальной фазе роста. На 3-и сутки культура перешла от экспоненциальной к линейной фазе роста, которая продолжалась по 5-6-е сутки. Аппроксимация этих фаз простыми уравнениями (Тренкеншу, 2005а, б), позволила определить величины максимальной продуктивности культуры ( $P_m$ ) и удельной скорости роста ( $\mu$ ) для каждого из вариантов эксперимента (табл. 1) (Горбунова, 2010). Далее следовала фаза замедления роста, а затем – фаза отмирания. По мере роста культуры наблюдали уменьшение концентрации минеральных форм азота и фосфора в среде. Начальная концентрация  $P-PO_4$  в питательных средах шести культиваторов составляла 10 – 100 мг·л<sup>-1</sup>. В течение экспоненциальной фазы роста во всех вариантах происходило её незначительное уменьшение, а с началом линейной фазы концентрация  $P-PO_4$  линейно снижалась и на 7-е сутки в вариантах *E* и *F* достигла нулевого значения (рис. 2). Таким образом, в данных культиваторах началось лимитирование роста культуры *A. platensis* фосфором. В варианте *A* концентрация снизилась на 40 % (до 60,5 мг·л<sup>-1</sup>), в варианте *B* – на 50 % (до 30,5 мг·л<sup>-1</sup>), в варианте *C* – на 70 % (до 9,5 мг·л<sup>-1</sup>), в варианте *D* – на 80 % (до 5 мг·л<sup>-1</sup>).

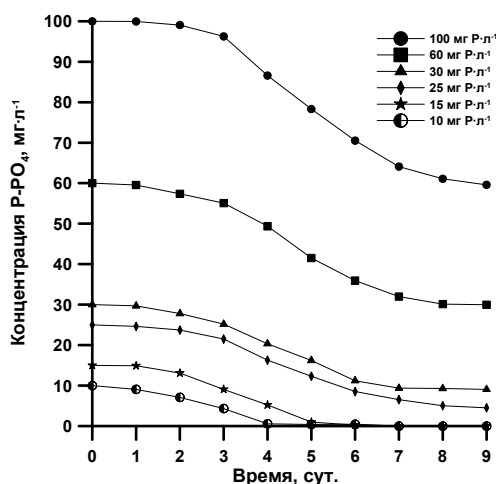


Рис. 2. Динамика концентрации  $P-PO_4$  в культуральной среде шести культиваторов (Горбунова, 2010)

Начальная концентрация азота N (в пересчёте на  $N-NO_3$ ) в среде составляла 425 мг·л<sup>-1</sup>. В течение экспоненциальной фазы роста наблюдалось её незначительное уменьшение. С началом линейной фазы роста в вариантах *A*, *B*, *C*, *D* концентрация азота интенсивно снижалась с третьих по шестые сутки, а в вариантах *E*, *F* – с третьих по пятые сутки (рис. 3). В среднем концентрация нитратного азота была снижена на 71,3 % (до 303 мг·л<sup>-1</sup>).

Используя полученные значения кинетических ростовых характеристик культуры *A. platensis* и подход Р.П. Тренкеншу (2005а), рассчитывали величины потребностей артроспиры в  $N-NO_3$  и  $P-PO_4$ .

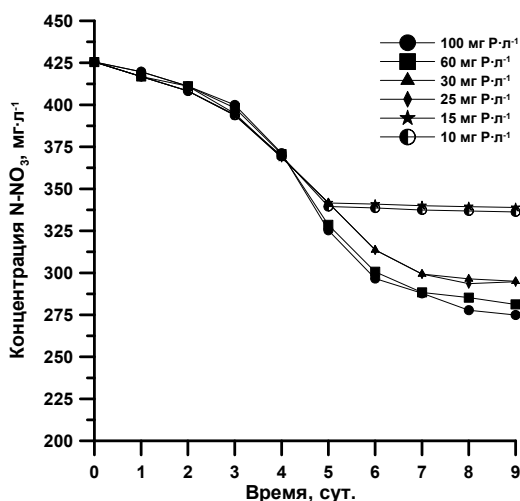


Рис. 3. Динамика концентрации N-NO<sub>3</sub> при различной концентрации P-PO<sub>4</sub> в культуральной среде (Горбунова, 2010)

Зависимость продуктивности накопительной культуры *A. platensis* от начальной концентрации фосфора в питательной среде представлена на рис. 4.

Таблица 1

Кинетические параметры роста накопительной культуры *Arthrospira platensis* (Горбунова, 2010)

Культиватор	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$P_m$ , г АСМ·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	$B_0$ , г АСМ·л <sup>-1</sup>	$B_m$ , г АСМ·л <sup>-1</sup>	Y (P), мг P·г <sup>-1</sup> АСМ	Y (N), мг N·г <sup>-1</sup> АСМ
A	0,76	0,58	0,20	2,8	13,8	61,1
B	1,01	0,54	0,41	2,6	12	60,9
C	0,82	0,42	0,27	2	10,5	59
D	1,01	0,41	0,41	1,8	10,5	59
E	1,02	0,38	0,43	1,4	10,3	58
F	0,97	0,32	0,14	1,4	10,1	57,1

Обозначения:  $\mu$  – удельная скорость роста;  $B_0$  – начальная плотность культуры;  $B_m$  – максимальная плотность культуры; Y (P) – потребность культуры в P-PO<sub>4</sub>; Y (N) – потребность культуры в N-NO<sub>3</sub>.

## Обсуждение

В литературе представлено большое количество кинетических моделей, описывающих зависимость роста водорослей (скорости реакций) от обеспеченности субстратом. Изменение скорости роста фитопланктона в условиях дефицита биогенных веществ можно описать уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$P = \frac{P_m \cdot S}{K_m + S},$$

где  $P$  – продуктивность культуры, г АСМ·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>;  $P_m$  – максимальная продуктивность культуры, г АСМ·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>;  $S$  – начальная концентрация субстрата, мг·л<sup>-1</sup>;  $K_m$  – константа полунасыщения.

Аппроксимацией экспериментальных данных накопительного режима культивирования определяли коэффициенты уравнения:  $P_m = 0,63$  г АСМ·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>;  $K_m = 11$ .

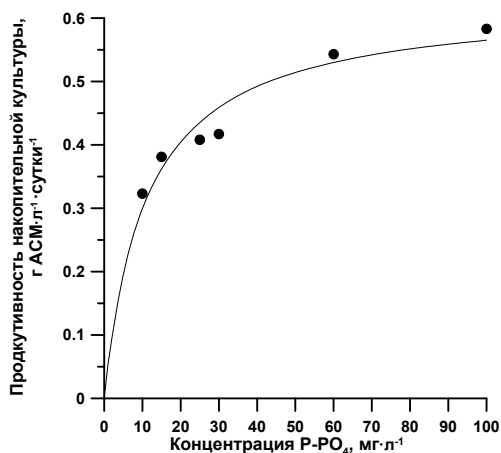


Рис. 4. Зависимость продуктивности накопительной культуры *Arthrospira platensis* от начальной концентрации P-PO<sub>4</sub> в питательной среде

Эти коэффициенты свидетельствуют о том, что максимальный предел продуктивности культуры *A. platensis* на среде Заррука в данных условиях составляет 0,63 г АСМ·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. При концентрации фосфора в среде 11 мг·л<sup>-1</sup> культура *A. platensis* достигнет половинного значения от максимальной продуктивности.

Таким образом, минеральный фосфор ассимилируется из питательной среды в соответствии с потребностями накопительной культуры *A. platensis* вне зависимости от его начальной концентрации. Только при сверхвысоких концентрациях (100 мг·л<sup>-1</sup>), не встречающихся в природных водоёмах или сточных водах, степень накопления фосфора превышает потребность в нём на 21 %. Константа Михаэлиса по P-PO<sub>4</sub> для артроспиры составляет 11 мг·л<sup>-1</sup>. Полученные результаты позволяют оценить возможности использования *A. platensis* в системах доочистки сточных вод от минеральных азота и фосфора. На практике система доочистки может осуществляться как в системах, использующих накопительные способы культивирования, так и в непрерывном режиме. Если использовать накопительный режим, то время очистки до уровня ПДК будет зависеть от концентраций загрязняющего вещества на входе в очистные сооружения и по накопительной кривой можно примерно оценить это время. Так, по фосфору доочистка сточных вод до нуля со-

ставит приблизительно 5 сут, при концентрации его в сточных водах на входе в очистные сооружения – до  $20 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$  (см. рис. 2). При необходимости снижения более высоких концентраций фосфора следует извлечь выросшую биомассу артроспиры и повторить накопительный процесс, т.е. фактически задать квазинепрерывный режим выращивания.

Для того, чтобы оценить соответствие характеристик накопительной и непрерывной культуры *A. platensis*, провели эксперимент по выращиванию микроводоросли в непрерывном режиме. Для культиваторов установили удельную скорость протока в соответствии с расчётными ростовыми характеристиками накопительных кривых (в рамках линейной фазы роста). Удельная скорость протока составила  $0,2 \text{ сут}^{-1}$ .

Так как динамика плотности непрерывной культуры *A. platensis* для вариантов *A* и *B*, *B* и *D*, *E* и *F* практически совпадает, в качестве примера на рис. 5 приведены данные для трех вариантов (*A* –  $100 \text{ мг P} \cdot \text{л}^{-1}$ , *C* –  $30 \text{ мг P} \cdot \text{л}^{-1}$  и *F* –  $10 \text{ мг P} \cdot \text{л}^{-1}$ ).

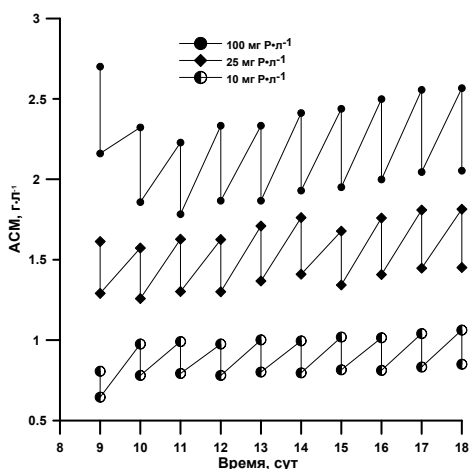


Рис. 5. Динамика биомассы непрерывной культуры *Arthrospira platensis* при различных концентрациях фосфора в культуральной среде

Таблица 2

**Кинетические параметры роста непрерывной культуры *Arthrospira platensis***

Культиватор	$P_m$ , $\text{г ACM} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$	$Y(P)$ , $\text{мг P} \cdot \text{г}^{-1} \text{ ACM}$	$Y(N)$ , $\text{мг N} \cdot \text{г}^{-1} \text{ ACM}$
<i>A</i>	0,54	13	61
<i>B</i>	0,52	11	60
<i>C</i>	0,41	10	59
<i>D</i>	0,4	11	59
<i>E</i>	0,29	10	55
<i>F</i>	0,22	9	56

С началом непрерывного процесса для вариантов *A* и *C* на 8-9-е сут отмечено снижение плотности непрерывной культуры по сравнению с

её уровнем при накопительном режиме, что объясняется адаптационными процессами в культуре к новым условиям. Затем плотность культуры возрастает. В это же время при концентрации фосфора  $10 \text{ мг P}\cdot\text{л}^{-1}$  (вариант *F*) наблюдалось увеличение плотности непрерывной культуры *A. platensis* с последующей её стабилизацией на 17-18-е сут на уровне  $1,02\text{--}1,04 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . Это объясняется тем, что к концу накопительного этапа в варианте *F* (на 7–9-е сут) в культиваторе лимитируется рост *A. platensis* фосфором (см. рис. 2), который полностью ассимилировался из питательной среды. Начало обмена питательной среды на 9-е сут и подача новых, недостающих источников питания стало основой для активного синтеза биомассы культуры микроводорослей.

Динамика  $\text{P-PO}_4$  и  $\text{N-NO}_3$  в культуральной среде при непрерывном режиме культивирования представлена на рис. 6.

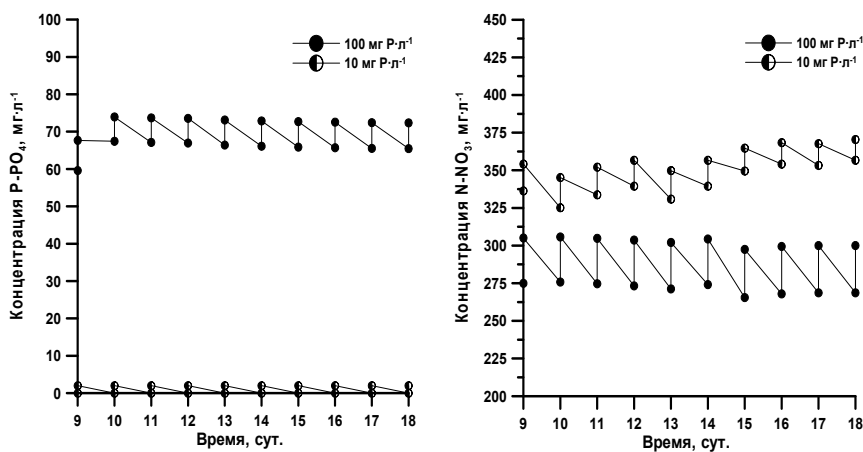


Рис. 6. Динамика концентрации  $\text{P-PO}_4$  и  $\text{N-NO}_3$  при различной концентрации  $\text{P-PO}_4$  в питательной среде

В качестве примера приведены графики по двум крайним случаям (варианты *A* –  $100 \text{ мг P}\cdot\text{л}^{-1}$  и *F* –  $10 \text{ мг P}\cdot\text{л}^{-1}$ ). Потребности *A. platensis* в  $\text{P-PO}_4$  и  $\text{N-NO}_3$ , рассчитанные по этим эмпирическим данным, свидетельствуют о совпадении результатов, полученных для накопительного и непрерывного режимов культивирования. Из табл. 1 и 2 видно, что данные, полученные при обоих способах культивирования артроспиры, практически совпадают.

В работе Р.П. Тренкеншу (2005б) теоретически доказано, что продуктивность непрерывной культуры микроводорослей, которая организована в рамках плотностей линейной фазы накопительной культуры, будет соответствовать максимальной продуктивности этого вида водорослей в тех же условиях. Максимальная продуктивность культуры определяется аппроксимацией экспериментальных данных линейной фазы роста водорослей линейным уравнением (Тренкеншу, 2005а). Зависимость продуктивности непрерывной культуры *A. platensis* от начальной концентрации фосфора в питательной среде представлена на рис. 7.



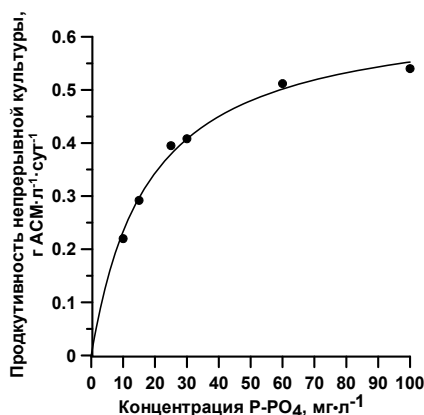


Рис. 7. Зависимость продуктивности непрерывной культуры *Arthrospira platensis* от начальной концентрации P-PO<sub>4</sub> в питательной среде

Аппроксимацией экспериментальных данных непрерывного режима культивирования определяли коэффициенты уравнения Михаэлиса-Ментен:  $P_m = 0,65$  г АСМ·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>;  $K_m = 18$ .

Данные коэффициенты свидетельствуют о практическом совпадении значений продуктивности артроспиры для накопительного и непрерывного режимов культивирования, что подтверждают теоретические разработки, изложенные в работе Р.П. Тренкеншу (2005б). Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют задавать чёткие условия для расчёта роста непрерывной культуры микроводорослей, в т.ч. при организации системы очистки сточных вод, а также определять концентрацию загрязняющих веществ на входе в очистные сооружения для снижения уровня загрязнения до ПДК (рис. 8).



Рис. 8. Динамика концентрации P-PO<sub>4</sub> в культуральной среде при выращивании *Arthrospira platensis*

При организации систем доочистки сточных вод с применением культуры *A. platensis* полученные зависимости по продуктивности и по-

требностям позволяют прогнозировать количество выращиваемой биомассы микроводорослей и, соответственно, степень и время доочистки сточных вод.

## Выводы

Экспериментально установлена гиперболическая зависимость продуктивности культуры *Arthrospira platensis* от обеспеченности минеральным фосфором. Максимальный предел продуктивности культуры *A. platensis* на среде Заррука составляет 0,63 г АСМ·л<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>. Минеральный фосфор ассимилируется из питательной среды в соответствии с потребностями накопительной культуры *A. platensis* вне зависимости от начальной концентрации фосфора. И только при сверхвысоких концентрациях (100 мг·л<sup>-1</sup>), не встречающихся в природных водоёмах или сточных водах, накопление биогенов превышает потребности культуры на 21 %. Полученные результаты можно использовать для расчёта систем очистки сточных вод. Система доочистки может осуществляться как в системах накопительного способа культивирования, так и в непрерывном режиме.

Полученные экспериментальные данные позволяют задавать чёткие условия для расчёта системы очистки и определять концентрации загрязняющих веществ на входе в очистные сооружения для снижения уровня загрязнения до ПДК.

При организации систем доочистки сточных вод с применением непрерывной культуры *A. platensis* полученные зависимости по продуктивности и потребностям позволят прогнозировать количество выращиваемой биомассы микроводорослей и, соответственно, степень и время доочистки сточных вод.

Артюхова В.И. Кинетика роста, потребления и потребности в азоте и фосфоре четырёх видов зелёных микроводорослей // Вестн. Моск. ун-та. Биология. – 1988. – 1. – С. 32–39.

Горбунова С.Ю., Боровков А.Б. Ростовые и ассимиляционные характеристики культуры *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при различных концентрациях фосфора в питательной среде // Экол. моря. – 2010. – Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. – С. 34–40.

Колесников В.П., Вильсон Е.В. Современное развитие технологических процессов очистки сточных вод в комбинированных сооружениях. – Ростов-н/Д: Юг, 2005. – 212 с.

Левич А.П., Ревкова Н.В., Булгаков Н.Г. Процесс «потребление-рост» в культурах микроводорослей и потребности клеток в компонентах минерального питания // Экологический прогноз. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1986. – С. 132–140.

Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: Изд-во ВНИРО, 1988. – 25 с.

Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура // Экол. моря. – 2005а. – 67. – С. 89–97.

Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 2. Квазинепрерывная культура // Там же. – 2005б. – 67. – С. 98–110.

Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. – Рига: Зинатне, 1983. – 320 с.

*Contribution a l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de Spirulina platensis* (Setch. et Gardner) Geitler: Abstr. Ph.D (Biol.). – Paris, 1966.

Получена 10.02.10

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова

*S.Yu. Gorbunova, A.B. Borovkov, R.P. Trenkenshu*

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas,  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
2, Nakhimov Prosp., 99011 Sevastopol, Ukraine  
e-mail: svetlana\_8423@mail.ru, spirit2000@ua.fm, trenkens@yandex.ru

PRODUCTIVITY OF CULTURE OF *ARTHROSPIRA PLATENSIS* (NORDST.)  
GEITLER (*CYANOPROKARYOTA*) AT DIFFERENT MATERIAL WELL-BEING BY  
MINERAL PHOSPHORUS

Kinetic growth and use of nitrogen and phosphorus by prokaryotic microalgae *Arthrospira platensis* culture were investigated. A consumption of mineral forms of nitrogen and phosphorus depending on concentration of biogenes in the culture was estimated.

**Key words:** *Arthrospira platensis*, biogenes, productivity.