

УДК 582.263: 546.712:577.112

И.А. ИЛЮЧИК

старший преподаватель
кафедры биотехнологии¹

Е.М. КАНДЫБА

студент¹

В.Н. НИКАНДРОВ, д-р биол. наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии¹

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 10 октября 2019г.

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК
КУЛЬТУРЫ *CHLORELLA VULGARIS* ШТАММА *IBCE C-19*
ПРИ РОСТЕ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ С КАРБОНАТОМ АММОНИЯ**

*Изучена динамика биомассы, внутриклеточного белка, хлорофиллов **a** и **b**, каротиноидов в клетках культуры *Chlorella vulgaris* штамма *IBCE C-19* при культивировании в течение 21 суток на оригинальной среде Тамия, при исключении из нее KNO_3 и замене нитратов карбонатом аммония в концентрациях 2,98, 3,58, 4,77 г/л, а также 2,98 г/л + ортофосфат калия в концентрации, увеличенной на 25%. Установлено, что исключение из питательной среды источника азота замедляло прирост биомассы, но к концу эксперимента ее уровень существенно не уступал максимальному значению на питательной среде полного состава. Рост на безазотной среде сопряжен с постепенным снижением уровня внутриклеточного белка, хлорофилла **b** и каротиноидов, хлорофилла **a** мало отличался от роста на контрольном варианте питательной среды. Замещение нитрата калия карбонатом аммония, судя по динамике биомассы, внутриклеточного белка, хлорофиллов **a** и **b**, каротиноидов, отрицательно сказывалось на культуре указанного штамма хлореллы.*

Ключевые слова: хлорелла, культивирование, питательные среды, источники азота, биомасса, белок, хлорофиллы, каротиноиды.

ILYUCHYK Irina A.

Senior Lecturer of the Department of Biotechnology¹

KANDYBA E.M.

Student¹

NIKANDROV Vitaliy N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor,

Professor of the Department of Biotechnology

¹Pollesky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**PHYSIOLOGY AND BIOCHEMICAL STATE OF *CHLORELLA VULGARIS* *IBCE C-19*
CELL DURING THE CULTURE GROWTH
ON MEDIUM WITH AMMONIUM CARBONATE**

*The dynamics of biomass, intracellular protein, chlorophylls **a** and **b**, carotenoids in *Chlorella vulgaris* strain *IBCE C-19* cells, when cultured for 21 days on (1) the original Tamiya medium, (2) medium without KNO_3 , media without KNO_3 , but with addition of ammonium carbonate at concentrations (3)2.98, (4)3.58, (5)4.77 g/L, (6) without KNO_3 but with 2.98 g/L ammonium carbonate and of potassium phosphate at concentration 25% greater than in original Tamiya medium were studied. The exclusion of nitrogen source from the medium slowed biomass accumulation, but at the experiment end the biomass*

level was not significantly lower than the maximum value on the whole composition medium. Growth on the nitrogen-free medium was associated with a gradual decrease in the content of intracellular protein, chlorophyll b and carotenoids, but chlorophyll a content was little different from the culture on original medium. The substitution of potassium nitrate with ammonium carbonate had negative effect on the development of the used Chlorella strain, judging by the dynamics of biomass, intracellular protein, chlorophylls a and b, carotenoids.

Keywords: *chlorella, culture, nutrient media, nitrogen sources, biomass, protein, chlorophylls, carotenoids.*

Введение. Как уже отмечено в наших предыдущих статьях [например, 1], на одноклеточную водоросль *Chlorella* на протяжении последних десятилетий обращено внимание биотехнологии, поскольку ее виды являются не только продуцентами так называемого «одноклеточного белка», но и целого ряда других ценных биогенных соединений. Среди последних достаточно упомянуть цианкобаламин – витамин В₁₂.

Интенсификация биотехнологии *Chlorella* предусматривает углубленное изучение биологии данной культуры, без чего невозможно разработать принципиально новые подходы к ведению культуры.

Одним из краеугольных вопросов биологии хлореллы является оптимизация состава питательных сред, предназначенных для получения целевых продуктов жизнедеятельности водоросли. В свою очередь, такая оптимизация зиждется на выяснении оптимальных источников углерода и азота.

Имеющиеся данные литературы свидетельствуют о том, что используемый в питательных средах нитрат калия может быть без ущерба заменен солями аммония, мочевиной. Считают, что это не только уменьшает возможность защелачивания среды, но и способствует более эффективной ассимиляции углекислоты. Отмечают, что хлорелла в первую очередь использует аммонийный азот, а потом уже нитраты. Полагают, что при ассимиляции нитратов возникает своего рода конкуренция за поток электронов с ассимиляцией CO₂, что сопровождается снижением эффективности усвоения последней [2].

Примечательно, что НАДФ-зависимая глутаматдегидрогеназа отсутствует в клетках термофильного штамма *Chlorella pyrenoidosa* Pringehelm 82T при росте на среде с нитратом, но синтезируется *de novo* в присутствии ионов аммония [3].

Вместе с тем, при высокой концентрации солей аммония динофитная водоросль *Prorocentrum cordatum* не росла, по мнению авторов, из-за токсического действия этих

соединений [4]. Более того, были выявлены видовые различия реакции динофитных водорослей на аммонийные соли в диапазоне концентраций (образно говоря, пределы толерантности).

Относительно *Chlorella vulgaris*, тем не менее, в литературе отсутствуют конкретные сведения об особенностях физиолого-биохимического состояния клеток при замене нитратов в составе питательной среды на соли аммония.

В связи с изложенным целью настоящей работы и явилось выявление состояния физиолого-биохимического состояния клеток *Chlorella vulgaris* штамма *IBCE C-19* в динамике роста культуры на питательной среде, содержащей карбонат аммония.

Материалы и методы. Исследования выполнены на культуре *Chlorella vulgaris*, штамм *IBCE C-19* из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, любезно предоставленной сотрудниками альгологического центра института.

Хлореллу выращивали в условиях периодической культуры на среде Таммийя [5] при различном режиме азотистого питания. Контролем служила оригинальная среда Таммийя, содержащая 5 г/л KNO₃ (концентрация азота соответствовала 0,693 г/л). В трех опытных вариантах концентрация карбоната аммония (NH₄)₂CO₃ составляла 2,98, 3,58, 4,77 г/л (это соответствовало уровню азота 0,870, 1,043, 1,390 г/л). В четвертом опытном варианте вместо удаленного KNO₃ не добавляли (NH₄)₂CO₃. Дефицит калия компенсировали добавлением K₂SO₄. Во всех данных вариантах питательной среды уровень фосфора соответствовал 0,285 г/л. В пятом опытном варианте питательной среды при концентрации (NH₄)₂CO₃ 2,98 г/л уровень фосфора увеличивали на 25% – до 0,356 г/л добавлением KH₂PO₄.

Микроводоросль культивировали при температуре 25±1 С, непрерывном перемешивании суспензии воздухом со скоростью 25 л/ч, освещенности на поверхности сосуда

– 5000 лК, продолжительности световых и темновых фаз – 12ч/12ч. Посевная доза составляла $2,73 \pm 0,12$ млн/мл клеток (освобожденных от предыдущей питательной среды и отмытых изотоническим раствором хлорида натрия).

Концентрацию клеток хлореллы определяли с помощью камеры Горяева на 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-е сутки культивирования. Отбирали аликвоты культуры, содержащие по $10 \pm 0,39$ млн клеток, отделяли их центрифугированием и отмывали трижды от культуральной жидкости дистиллированной водой при 6000 об/мин в течение 10 мин. Клетки разрушали в темноте как описано [6] при 4 °С в 0,50 мл бидистиллированной воды. Полученный гомогенат использовали для определения концентрации общего белка в клетках методом Bradford [7] и пигментов хлорофиллов и каротиноидов спектрофотометрическим методом [8] с экстракцией ацетоном.

Все исследования выполнены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы *Statistica 6.0* с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Характер накопления биомассы в процессе культивирования данного штамма хлореллы был неожиданным. Удаление из питательной среды источника азота замедляло увеличение

количества клеток. Если в контрольном варианте максимум показателя отмечен на 9 и 11 сутки, то при удалении из питательной среды KNO_3 в эти сроки концентрация биомассы была ниже контрольного варианта на 48 и 37% соответственно (таблица 1, рисунок 1). Однако к концу культивирования уровень биомассы безазотного варианта уступал максимальному значению контрольного варианта лишь на 5%. Можно думать, что накопленных в инокуляте резервов оказалось достаточно для замедленного, но достаточно полного развития культуры.

Далее оказалось, что замена нитрата калия карбонатом аммония отрицательно сказалась на росте культуры хлореллы: во всех вариантах максимальная концентрация биомассы отмечена на 3 и 5 сутки и ее величина на 71–76% уступала таковой контрольного варианта. Ситуация не изменялась в случае дополнительного введения в среду ортофосфата. Вместе с тем, в первые сутки культивирования на всех опытных вариантах среды, включая безазотный, концентрация биомассы превосходила таковую контрольного варианта на 40–48% с максимумом в случае как раз безазотного варианта.

Что касается внутриклеточного белка, то в контрольном варианте концентрация его достигала максимума также на 9 и 11 сутки.

Таблица 1. – Сдвиги уровня биомассы (млн клеток/мл) культуры хлореллы при росте на различных источниках азота в питательной среде, $n = 9$

Сутки	Концентрация солей					
	KNO_3 , 5 г/л (контроль)	$(NH_4)_2CO_3$, г/л				
		0	2,98	3,58	4,77	2,98 ^(а)
1	$2,63 \pm 0,01$	$3,90 \pm 0,01^*$	$3,67 \pm 0,03^*$	$3,80 \pm 0,01^*$	$3,75 \pm 0,02^*$	$3,68 \pm 0,00^*$
3	$3,25 \pm 0,01$	$3,98 \pm 0,00^*$	$3,31 \pm 0,00$	$3,30 \pm 0,03$	$3,62 \pm 0,00$	$3,33 \pm 0,00$
5	$6,31 \pm 0,01$	$4,51 \pm 0,04^*$	$2,98 \pm 0,01^*$	$2,98 \pm 0,00^*$	$3,24 \pm 0,01^*$	$2,99 \pm 0,02^*$
7	$7,56 \pm 0,06$	$6,25 \pm 0,01^*$	$2,76 \pm 0,01^*$	$2,27 \pm 0,01^*$	$3,01 \pm 0,01^*$	$2,52 \pm 0,00^*$
9	$12,06 \pm 0,01$	$6,33 \pm 0,00^*$	$2,11 \pm 0,01^*$	$2,25 \pm 0,01^*$	$2,75 \pm 0,00^*$	$2,50 \pm 0,00^*$
11	$12,38 \pm 0,00$	$7,84 \pm 0,02^*$	$1,83 \pm 0,00^*$	$2,09 \pm 0,01^*$	$2,49 \pm 0,01^*$	$2,28 \pm 0,01^*$
13	$11,64 \pm 0,07$	$8,02 \pm 0,02^*$	$0,98 \pm 0,02^*$	$0,92 \pm 0,00^*$	$2,75 \pm 0,01^*$	$1,01 \pm 0,03^*$
15	$11,55 \pm 0,02$	$10,24 \pm 0,00^*$	$1,00 \pm 0,00^*$	$0,93 \pm 0,00^*$	$2,41 \pm 0,00^*$	$1,00 \pm 0,03^*$
17	$11,54 \pm 0,01$	$11,01 \pm 0,00$	$0,30 \pm 0,00^*$	$0,75 \pm 0,00^*$	$1,48 \pm 0,00^*$	$0,75 \pm 0,01^*$
19	$11,08 \pm 0,04$	$11,01 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01^*$	$0,62 \pm 0,01^*$	$1,00 \pm 0,01^*$	$0,62 \pm 0,00^*$
21	$10,49 \pm 0,01$	$11,80 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,00^*$	$0,50 \pm 0,00^*$	$0,61 \pm 0,01^*$	$0,49 \pm 0,01^*$

Примечание – здесь и далее – * – данные статистически достоверны при $P \leq 0,05$;

(а – концентрация фосфора в среде увеличена на 25% до 0,356 г/л

В то же время при удалении из питательной среды нитрата калия наблюдали рост этого показателя до 7 суток на 11–43%, однако максимальное его значение в этом варианте на 29% уступало таковому контрольного варианта, что, на наш взгляд, вполне естественно (таблица 2, рисунок 1).

Вторая неожиданность состояла в том, что замена нитрата калия карбонатом аммония приводила к небольшому росту уровня внутриклеточного белка в опытных вариантах в сравнении с контролем только в период 1–5 суток.

Так, на первые сутки в вариантах с $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ концентрация внутриклеточного белка была на 37–47% выше, чем при культивировании на питательной среде с нитратом калия. На третьи сутки роста культуры на среде с карбонатом аммония это превышение составило 39–85% по отношению к контролю. А на пятые сутки такое увеличение – на 30% практически проявилось лишь в варианте, содержащем карбонат аммония в максимальной концентрации.

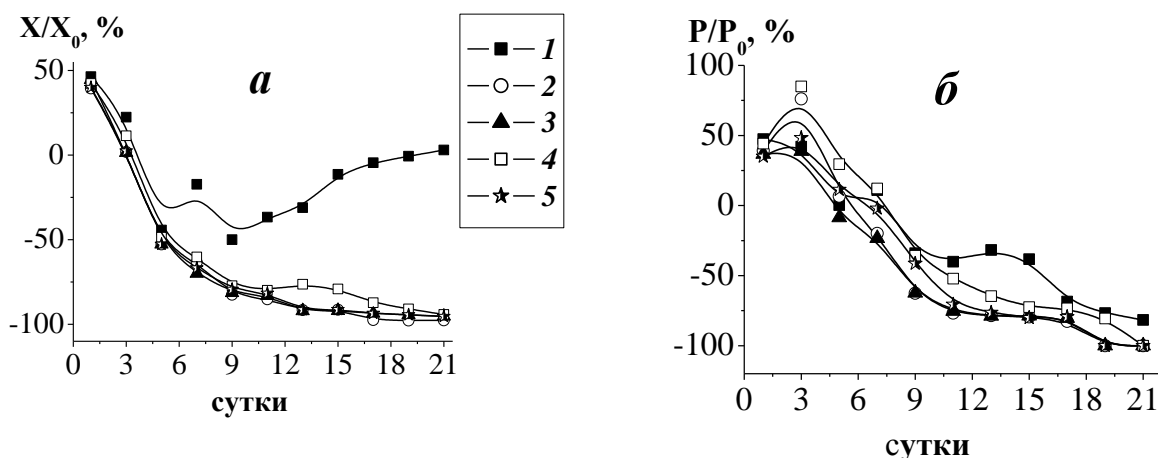


Рисунок 1. – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) уровня биомассы культуры хлореллы (а) и внутриклеточного белка (б) при росте на питательных средах с $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л: 0 (1), 2,98 (2), 3,58 (3), 4,77 (4) и 2,98 при увеличении концентрации фосфора на 25% (5)

Таблица 2. – Изменения содержания внутриклеточного белка (мкг/мл млн клеток) культуры хлореллы при росте на различных источниках азота в питательной среде, $n = 9$

Сутки	Концентрация солей					
	KNO_3 , 5 г/л (контроль)	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л				
		0	2,98	3,58	4,77	2,98 ^(а)
1	33,49±0,01	49,34±0,02*	46,62±0,01*	45,77±0,01*	48,29±0,06*	45,22±0,02*
3	43,57±0,16	61,87±0,15*	76,74±0,21*	60,46±0,03*	80,61±0,07*	64,59±0,04*
5	75,58±0,26	75,77±0,31*	80,54±0,02*	69,06±0,04*	97,88±0,02	84,19±0,02*
7	83,10±0,02	92,25±0,04*	66,60±0,03*	63,62±0,03*	93,14±0,01	81,37±0,05
9	123,02±0,01	81,10±0,01*	45,93±0,05*	46,27±0,04*	78,97±0,10*	72,18±0,03*
11	129,34±0,13	77,53±0,05*	30,12±0,09*	31,89±0,04*	61,80±0,01*	38,11±0,05*
13	103,49±0,03	70,70±0,02*	22,13±0,02	21,89±0,02	36,60±0,07	24,43±0,17*
15	97,72±0,09	60,28±0,01*	20,00±0,01*	20,86±0,02*	26,85±0,05	19,44±0,02*
17	93,80±0,06	29,50±0,09*	16,25±0,01*	18,45±0,02*	24,89±0,02*	19,22±0,01*
19	93,40±0,01	21,73±0,11*	0	0	18,11±0,18*	0
21	95,07±0,02	17,43±0,03*	0	0	0	0

Обогащение «аммонийной» питательной среды ортофосфатом также сопровождалось увеличением роста концентрации внутриклеточного белка по сравнению с контролем в период 1–5 сутки на 11–48%. Тогда как на 7 сутки уровень его практически не отличался от такового контрольного варианта.

В дальнейшем, как и во всех вариантах питательной среды с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, шло быстрое снижение уровня внутриклеточного белка. По завершении культивирования при минимальной концентрации биомассы содержание белка было настолько мало, что вовсе не определялось (таблицы 1 и 2).

Содержание хлорофилла *a* в контрольном варианте достигало максимального уровня на 9–15 сутки (таблица 3). При этом увеличение его уровня в сравнении с началом культивирования составило 13–20%.

Примечательно, что исключение нитрата калия из питательной среды практически не вело к существенным изменениям содержания хлорофилла *a* на всем протяжении культивирования, несмотря на рост уровня биомассы. Уровень этой формы хлорофилла в период 9–17 суток снижался в сравнении с контрольным вариантом лишь на 16–25% (рисунок 2).

При замене нитрата калия карбонатом аммония в концентрации 2,98 г/л содержание

хлорофилла *a* снижалось на всем протяжении культивирования, и в конечный период эта убыль составила 93% в сравнении с началом культивирования и с контрольным вариантом.

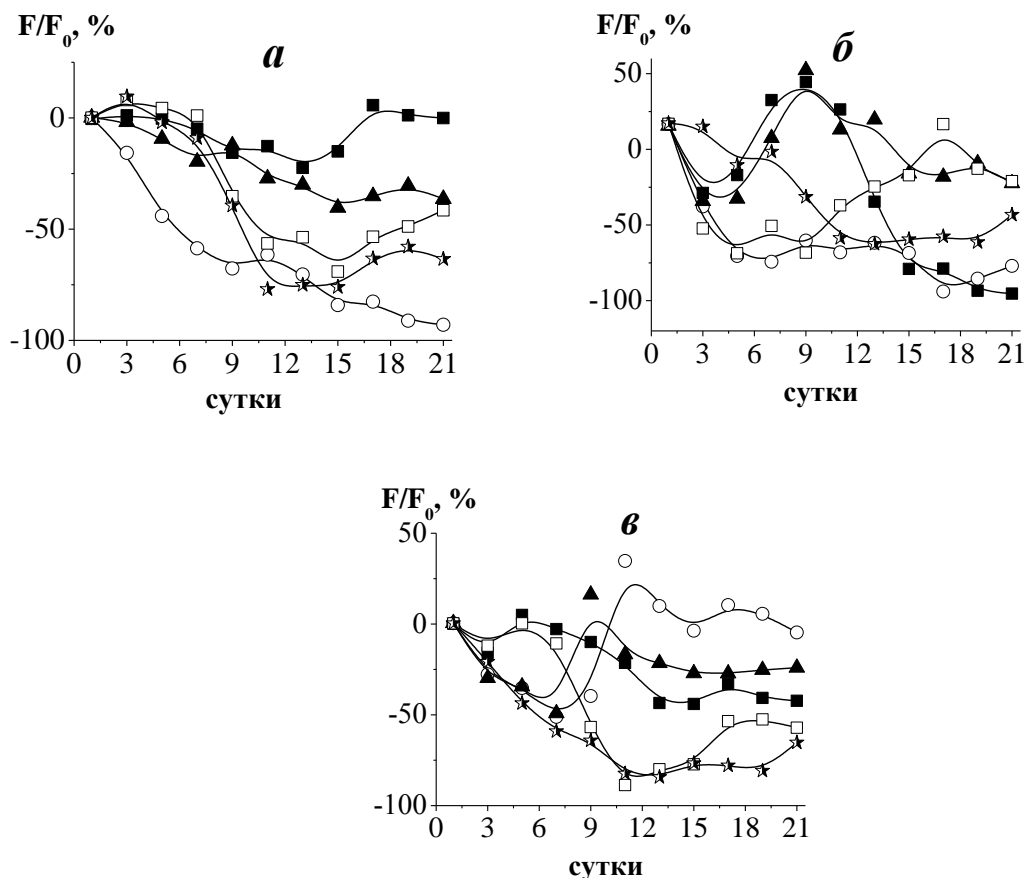
Увеличение концентрации карбоната аммония до 3,58 г/л хотя и вызвало уменьшение концентрации пигмента, однако оно было менее критическим: в сравнении с началом культивирования на 21 сутки убыль составила 37%, а в сопоставлении с контрольным вариантом – 27–40%, хотя, в целом, на протяжении 13 суток содержание хлорофилла *a* колебалось в пределах 20%.

При дальнейшем увеличении концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ до 4,77 г/л содержание хлорофилла *a* в клетках на протяжении 7 суток было стабильно и не отличалось от контрольного варианта, а затем постепенно снижалось на 42% к концу культивирования. Близкая картина наблюдалась и в варианте с обогащением среды ортофосфатом, лишь снижение содержания этой формы хлорофилла к концу культивирования достигало 74%.

Иная картина наблюдалась в отношении хлорофилла *b*. В контрольном варианте уровень этого пигмента нарастал до 13 суток в 4,25 раза (таблица 4).

Таблица 3. – Содержание хлорофилла *a* (мг/млн клеток) в клетках хлореллы при росте на различных источниках азота в питательной среде, $n = 9$

Сутки	Концентрация солей					
	KNO_3 , 5 г/л (контроль)	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л				
		0	2,98	3,58	4,77	2,98 ^(a)
1	43,18±0,17	43,03±0,56	43,18±0,51	43,25±0,14	43,20±1,20	43,20±0,91
3	42,15±0,19	42,60±0,78	35,51±0,79*	41,39±1,02	45,55±1,00	46,17±0,17
5	42,70±0,27	42,59±0,89	23,88±0,11*	38,69±0,94	44,58±0,71	41,85±0,69
7	44,03±0,45	41,88±1,40	18,20±0,14*	35,38±0,21*	44,48±1,04	40,03±0,33
9	49,56±0,21	41,75±0,71*	16,00±0,92*	43,47±0,90*	32,04±0,28*	30,00±0,73 *
11	48,82±0,21	42,60±1,30*	18,81±0,67*	35,56±1,01*	21,26±0,90*	11,23±0,56*
13	49,37±0,67	38,28±0,26*	14,60±0,68*	34,59±0,33*	22,87±0,91*	12,33±0,34*
15	51,71±1,00	43,93±0,13*	8,20±0,79*	30,85±0,17*	15,99±0,25*	12,42±0,23*
17	43,96±0,78	46,48±0,14	7,66±0,22*	28,51±0,82*	20,46±0,93*	16,16±0,18*
19	42,99±0,47	43,50±1,00	3,81±0,46*	29,95±0,91*	22,00±0,20*	18,10±0,19*
21	42,92±0,22	42,87±0,63	3,03±0,01*	27,27±0,73*	25,10±0,84*	15,67±0,09*



Рисунк 2. – Изменения (% к контролю, принятому за 100%) содержания хлорофиллов *a* (*a*), *b* (*б*) и каротиноидов (*в*) при росте на питательных средах с $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л: 0 (1), 2,98 (2), 3,58 (3), 4,77 (4) и 2,98 при увеличении концентрации фосфора на 25%; обозначения те же, что в рисунке 1

Таблица 4. – Динамика содержания хлорофилла *b* (мг/млн клеток) в клетках хлореллы при росте на различных источниках азота в питательной среде, $n = 9$

Сутки	Концентрация солей					
	KNO_3 , 5 г/л (контроль)	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л				
		0	2,98	3,58	4,77	2,98 ^(а)
1	12,42±0,14	14,47±0,59*	14,48±0,31*	14,35±0,11*	14,51±0,40*	14,56±0,24*
3	29,44±0,99	20,96±0,42*	18,32±0,51*	19,36±0,31*	14,05±0,71*	33,87±0,23*
5	36,33±0,34	30,14±0,71*	10,71±0,28*	24,49±0,23*	11,36±0,48*	32,53±0,18*
7	36,98±0,23	49,02±0,17*	9,48±0,36*	39,75±0,33	18,24±0,21*	36,40±0,36
9	43,92±0,78	63,40±0,22*	17,43±0,45*	66,87±0,24*	13,90±0,08*	30,07±0,34*
11	51,70±0,89	65,31±1,04*	16,49±0,34*	58,46±0,11*	32,55±0,23*	21,41±0,03*
13	52,89±0,43	34,56±0,27*	20,23±0,32*	63,29±0,27*	39,89±0,21*	19,80±0,10*
15	52,13±0,23	10,91±0,14*	16,42±0,20*	43,77±0,07*	43,20±0,55*	21,12±0,20*
17	46,11±0,28	9,77±0,24*	2,77±0,22*	37,77±0,32*	53,77±0,24*	19,58±0,14*
19	42,90±0,61	2,78±0,10*	6,23±0,11*	38,97±0,16	37,38±0,13*	16,55±0,12*
21	44,28±0,70	2,04±0,37*	10,16±0,10*	34,36±0,12*	34,96±0,61*	25,13±0,23*

При исключении из питательной среды нитрата калия содержание хлорофилла *b* увеличилось с максимумом на 11 сутки в 4,5 раза в сравнении с началом культивирования и 23% превышало максимальный уровень контрольного варианта (таблица 4, рисунок 2). Возможно, подобный характер сдвигов содержания этой формы хлорофилла носит адаптационно-приспособительный характер, обусловленный уменьшением уровня хлорофилла *a*.

Введение в питательную среду карбоната аммония в минимальной концентрации, как и указано выше по тексту для хлорофилла *a*, приводило к резкому уменьшению и этой формы пигмента. Особенность, на наш взгляд, состояла в периодическом изменении содержания хлорофилла *b*. Так, в период 3-и сутки культивирования концентрация его снижалась на 48%. Затем с 7 до 13 суток она возрастала в 2,1 раза, а к 17 суткам вновь уменьшалась на 84%.

Увеличение концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ до 3,58 г/л сопровождалось изменениями содержания хлорофилла *b* близкими таковым безазотного варианта. Однако в этом случае уровень пигмента к концу культивирования оставался достаточно высоким, уступая таковому в контрольном варианте лишь на 22%.

Дальнейшее обогащение питательной среды карбонатом аммония характеризовалось относительно небольшими изменениями концентрации данного пигмента на протяже-

нии 9 суток при уменьшении ее в сравнении с контролем на 51–69%. К 11 суткам уровень хлорофилла *b* в этом варианте возрастал в 2,3 раза, достигая максимума через 17 суток и не уступая максимуму контрольного варианта.

Обогащение же питательной среды ортофосфатом вызвало рост содержания хлорофилла *b* с первых по седьмые сутки в 2,5 раза в сравнении с началом культивирования, практически не уступая контрольному варианту. Однако при дальнейшем культивировании содержание этого пигмента постепенно снижалось.

Еще одной неожиданностью явились сдвиги отношения содержания хлорофилла *a*/хлорофилла *b*. При росте на среде с нитратом калия практически на протяжении всего эксперимента величина этого отношения с 3,48 постепенно снижалась (рисунок 3).

На безазотном варианте питательной среды в период 1–11 сутки развития культуры эта величина также снижалась, причем изменения были большими, чем в контрольном варианте. Однако через 13 суток это отношение возрастало и в дальнейшем наблюдался непрерывный рост величины отношения содержания хлорофилла *a*/хлорофилла *b*, которая к концу эксперимента превышала исходное значение более чем в 7 раз, а таковую величину в контрольном варианте питательной среды к концу культивирования почти в 22 раза.

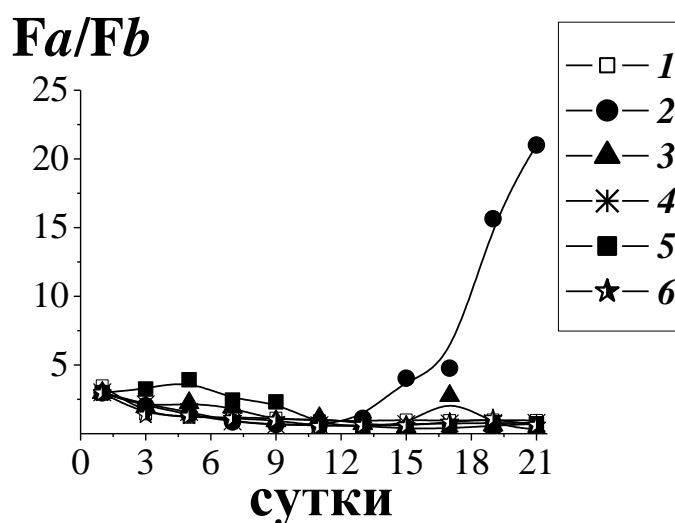


Рисунок 3. – Динамика величины отношения содержания хлорофилл *a*/хлорофилл *b* при росте на питательных средах с KNO_3 (1) и $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л: 0 (2), 2,98 (3), 3,58 (4), 4,77 (5) и 2,98 при увеличении концентрации фосфора на 25% (6)

Замена нитратов карбонатом аммония при концентрации его в питательной среде 2,98 г/л также сопровождалась уменьшением величины данного отношения вплоть до 17 суток, когда она возростала, достигая 93% от исходного значения и превышая таковое в контрольной группе почти в 3 раза. Обогащение питательной среды $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ до 3,58 г/л вело в течение культивирования к постепенному снижению указанного показателя. А при дальнейшем увеличении концентрации соли до 4,77 г/л наблюдалось замедление снижения величины отношения хлорофилл *a*/хлорофилл *b*. Так, через 9 суток она составляла 77,5% исходного уровня и более чем в 2 раза превосходила таковую контрольного варианта в этот срок. Кроме того, в период 17–21 сутки величина этого отношения возростала в 1,9 раза.

Увеличение в питательной среде концентрации ортофосфата при минимальном уровне карбоната аммония вело к проявлению динамики отношения хлорофилл *a*/хлорофилл *b*, сходной с наблюдавшейся при росте культуры хлореллы на контрольном варианте питательной среды.

Введение в питательную среду $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ вместо KNO_3 отразилось и на уровне в клетках каротиноидов (таблица 5, рисунок 2).

При росте на питательной среде с нитратами концентрация каротиноидов в клетках хлореллы увеличивалась, начиная с 9 суток, и достигала максимума через 15 суток – 151% от исходного уровня. Затем она не-

сколько уменьшалась, тем не менее превышая начальные значения на 30% (таблица 5). В соответствии с этим, в период 11–21 сутки отмечен и рост желто-зеленого индекса (таблица 6).

На безазотной питательной среде на протяжении 9 суток концентрация каротиноидов в клетках хлореллы практически не менялась и мало отличалась от таковой контрольного варианта питательной среды (таблица 5, рисунок 2). Однако затем она несколько уменьшалась и к концу эксперимента составляла 75% таковой контрольного варианта. Величина желто-зеленого индекса принципиально не менялась на протяжении всего времени культивирования водоросли. Однако, начиная с 13 суток, она по сравнению с контрольным вариантом уменьшалась в 1,4–1,7 раза.

Введение в питательную среду карбоната аммония в минимальной концентрации в период роста культуры хлореллы 1–7 сутки вызвало снижение концентрации каротиноидов практически в 2 раза и по сравнению с началом роста культуры на такой среде и по сравнению с контрольным вариантом.

Затем содержание каротиноидов в клетках увеличивалось, достигая максимума через 11 суток и превосходя исходную концентрацию почти в 2 раза, концентрацию пигментов в этот срок контрольного варианта на 38%, а максимальную концентрацию в последнем – на 30%.

Таблица 5. – Содержания каротиноидов (мг/млн клеток) в клетках хлореллы при росте на различных источниках азота в питательной среде, $n = 9$

Сутки	Концентрация солей					
	KNO_3 , 5 г/л (контроль)	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, г/л				
		0	2,98	3,58	4,77	2,98 ^(a)
1	33,52±0,78	33,57±0,26	33,66±0,39	33,71±0,67	33,63±0,26	33,68±0,22
3	41,01±0,35	34,51±0,20*	29,64±0,21*	28,83±0,26*	36,13±0,23*	32,48±0,02*
5	33,59±0,13	35,27±0,21	21,74±0,12*	22,03±0,90*	33,72±1,20	18,94±0,21*
7	35,12±0,43	34,13±0,11	17,15±0,09*	17,87±0,94*	31,36±0,34*	14,40±0,38*
9	38,49±0,37	34,67±0,20	23,22±0,19*	44,74±0,93*	16,64±0,18*	13,81±0,11*
11	49,00±0,71	38,50±0,24*	66,04±0,14*	40,83±0,50*	5,54±0,93*	8,65±0,23*
13	49,88±0,20	28,19±0,19*	54,82±0,01	39,14±0,17*	9,97±0,74*	7,84±0,24*
15	50,64±0,30	28,34±0,22*	48,79±0,22	36,90±0,10*	11,50±0,50*	11,81±0,98*
17	49,20±0,80	32,93±0,37*	54,33±0,38	35,81±0,07*	22,89±0,10*	10,89±0,11*
19	44,86±0,74	26,62±0,00*	47,39±1,00	33,54±0,14*	21,30±0,25*	8,61±0,20*
21	43,54±0,68	25,15±0,08*	41,53±0,69	33,07±0,22*	18,68±0,14*	15,12±0,16*

Таблица 6. – Динамика изменения желто-зеленого индекса культуры хлореллы при росте на различных источниках азота в питательной среде, $n = 9$

Сутки	Концентрация солей					
	KNO ₃ , 5 г/л (контроль)	(NH ₄) ₂ CO ₃ , г/л				
		0	2,98	3,58	4,77	2,98 ^a
1	0,78±0,00	0,78±0,01	0,78±0,03	0,78±0,00	0,78±0,01	0,78±0,00
3	0,97±0,01	0,81±0,00*	0,83±0,01*	0,70±0,00*	0,79±0,01*	0,70±0,01*
5	0,79±0,00	0,83±0,01	0,91±0,01*	0,57±0,01*	0,76±0,03	0,45±0,01*
7	0,80±0,01	0,81±0,01	0,94±0,00*	0,51±0,00*	0,71±0,01*	0,36±0,02*
9	0,78±0,01	0,83±0,03	1,45±0,03*	1,03±0,00*	0,52±0,02*	0,46±0,01*
11	1,00±0,00	0,90±0,01	3,51±0,02*	1,15±0,01*	0,26±0,00*	0,77±0,01*
13	1,01±0,01	0,74±0,00*	3,75±0,01*	1,13±0,01*	0,44±0,00*	0,64±0,03*
15	0,98±0,02	0,65±0,00*	5,95±0,01*	1,20±0,02*	0,72±0,02*	0,95±0,00
17	1,12±0,01	0,71±0,01*	7,09±0,00*	1,26±0,01*	1,12±0,00	0,67±0,01*
19	1,04±0,00	0,61±0,00*	12,44±0,00*	1,12±0,03	0,97±0,01	0,48±0,00*
21	1,01±0,01	0,59±0,01*	13,80±0,02*	1,21±0,00*	0,70±0,02*	0,96±0,00

Вследствие этих сдвигов, а также уменьшения содержания хлорофиллов, начиная с 9-х суток, значение желто-зеленого индекса росло, превосходя начальную величину на протяжении оставшегося периода культивирования в 4,5–17,7 раза, а по сравнению с контрольным вариантом – в 3,5–13,7 раз.

Увеличение в питательной среде (NH₄)₂CO₃ до 3,58 г/л сопровождалось ростом концентрации каротиноидов в клетках водоросли до 9 суток на 33% по сравнению с исходным уровнем и постепенным снижением до исходных значений. Колебания значений желто-зеленого индекса в процессе роста, на наш взгляд, не носили принципиальный характер и не превышали 61% в сравнении с первыми сутками культивирования, а по сравнению с нитратной питательной средой – 12–63%.

Дальнейшее увеличение концентрации этого источника азота практически не вызвало на протяжении 7 суток каких-либо существенных сдвигов концентрации каротиноидов, а в период 7–11 сутки вело к резкому падению последней – в 5,7–6,1 раза. Однако в последующий период – 11–17 сутки уровень каротиноидов возрастал в 4,1 раза. В соответствии с этим и величина желто-зеленого индекса на протяжении 7 суток не менялась, но через 11 суток она уменьшалась в 2,7 раза. В последующий период культивирования наблюдалось увеличение индекса с максимумом через 17 суток в 4,3 раза, и он достигал значений контрольного варианта питательной среды.

Близкая картина сдвигов концентрации каротиноидов отмечена и при культивировании хлореллы на питательной среде с минимальной концентрацией карбоната аммония и дополнительным введением ортофосфата. Лишь в количественном плане подобные колебания внутриклеточного содержания каротиноидов были менее резкими. Изменения же величины желто-зеленого индекса имели колебательный характер: через 7 суток она уменьшалась более чем в 2 раза. Через 11 суток эта величина практически возвращалась к исходным значениям, достигала максимума через 15 суток, через 19 суток вновь уменьшалась в 2 раза, а через 21 сутки опять возрастала до максимальной величины.

Заключение. Представленные результаты культивирования *Chlorella vulgaris* штамма *IBCE C-19* на безазотной питательной среде, а также при замене нитрата калия карбонатом аммония носят неоднозначный характер.

Прежде всего, неожиданным явился тот факт, что удаление из питательной среды источника азота – нитрата калия хотя и замедляло рост биомассы, но к концу эксперимента ее уровень существенно не уступал максимальному значению питательной среды полного состава. Складывается впечатление, что в инокуляте (причем клеток, отмытых от среды роста) осталось достаточно резервов для замедленного, но полного по биомассе развития культуры на протяжении трех недель. Вполне естественно, что на рост безазотной среде сопряжен с постепенным снижением уровня внутриклеточного белка, хотя содержание главного фотосинтетического

пигмента – хлорофилла *a* мало отличалось от контрольного варианта питательной среды. Падала концентрация хлорофилла *b* и каротиноидов.

Замещение же нитрата калия карбонатом аммония, судя по полученным результатам, отрицательно сказывалось на культуре указанного штамма хлореллы. Ни в одном из вариантов питательной среды, содержащей соль аммония, в клетках культуры не был достигнут уровень биомассы контрольного варианта и даже безазотного. Положение не спасало и дополнительное введение ортофосфата в питательную среду с карбонатом аммония. Соответственно, и уровень внутриклеточного белка был ниже предела чувствительности метода его определения, несмотря на достаточно «приличное» содержание в вариантах питательной среды с карбонатом аммония в концентрации, например, 3,58 и 4,77 г/л фотосинтетических пигментов, не уступающих таковому при росте культуры на среде с нитратом калия. Эти результаты существенно отличаются от ранее известных из литературы.

Здесь возможно несколько вариантов причины подобных эффектов, среди которых может быть то обстоятельство, что избранные концентрации карбоната аммония находятся за пределами толерантности культуры. Более того, хорошо известно, что разные штаммы могут порой существенно различаться в реакциях на внешние факторы, включая источники питания. Возможно, описанные нами изменения являются отражением физиолого-биохимической специфики клеток *Chlorella vulgaris* штамма *IBCE C-19* отличающихся от известных из литературы для других видов хлореллы и других штаммов. Прояснение этих моментов требует проведения дальнейших исследований.

Список литературы

1. Ильючик, И. А. Рост культуры хлореллы (*Chlorella vulgaris*) и накопление белка при добавлении $MnCl_2$ в питательную среду / И. А. Ильючик, В. Н. Никандров // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2018. – № 1. – С. 53-64.
2. Упитис, В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига: Зинатне, 1983. – 240 с.
3. Софьин, А. В. Глутаматдегидрогеназы и регуляция ферментов ассимиляции аммо-

ния у одноклеточных зеленых водорослей: дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук по специальности 03.00.04 – Биохимия / Софьин Алексей Владимирович. – Москва, 1984. – 171 с.

4. Мансурова, И. М. Влияние различных источников азота на рост динофитовых водорослей Черного моря / И. М. Мансурова, Л. В. Стельмах // Вопросы современной альгологии. – 2014. – № 2 (6). URL: <http://algology.ru/598>.
5. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей / сост. С.С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 101 с.
6. Сиренко, Л. А. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л. А. Сиренко [и др.]; отв. ред. А.В. Топачевский; АН СССР, Ин-т гидробиологии. – Киев: Наукова думка, 1975. – 247 с.
7. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254
8. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова; под ред. И.П. Ермакова. – М.: Издательский центр «Академия», 2003. – 256 с.
9. Елизарова, В. А. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне водоемов разного типа : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.18 / В. А. Елизарова; Инс-т биологии внутренних вод АН СССР. – Москва, 1975. – 24 с.

References

1. Pyuchik I.A., Nikandrov V.N. Rost kulturyi hlorelyi (*Chlorella vulgaris*) i nakoplenie belka pri dobavlenii $MnCl_2$ v pitatelnyuyu sredu [*Chlorella vulgaris* culture growth and protein accumulation at $MnCl_2$ addition in nutrient medium]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhajnaga unIversIteta. Seryiya pryirodaznaychyih navuk* [Bulletin of Palesky State University. Series in Natural Sciences], 2018, no. 1, pp. 53-64. (In Russian)
2. Upitis V.V. *Makro- i mikroelementy v optimizacii mineral'nogo pitaniya mikrovodoroslej* [Macro and micronutrients in the optimization of mineral nutrition of microalgae]. Riga, Zinatne, 1983, 240 p. (In Russian)

3. Sofin A.V. *Glutamatdegidrogenazy i regulyaciya fermentov assi-milyacii ammoniya u odnokletochnyh zelenyh vodoroslej* [Glutamate dehydrogenase and regulation of ammonium assimilation enzymes in unicellular green algae]. Cand. sci. diss. Moskva, 1984, p. 171. (In Russian)
4. Mansurova I.M. Vliyanie razlichnyh istochnikov azota na rost di-nofitovyh vodoroslej Chernogo morya [The influence of various nitrogen sources on the growth of dinofit algae of the Black Sea]. *Voprosy sovremennoj algologii*. [Questions of modern algology.], 2014, no. 2. URL: <http://algology.ru/598>. (In Russian)
5. Mel'nikov S.S. et al. *Katalog geneticheskogo fonda khoziaistvenno poleznykh vidov vodoroslei* [Catalog of the genetic fund of economically useful species of algae]. Minsk, Belarusskaia navuka Publ, 2011, 101 p. (In Russian)
6. Sirenko L.A. et al. *Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovaniya vo-doroslej v gidrobiologicheskoy praktike* [Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice]. Ed. Topachevskij A.V. Kiev, AN SSSR, Institut gidrobiologii, Naukova dumka, 1975, 247 p. (In Russian)
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem*, 1976, vol. 72, pp. 248-254.
8. Gavrilenko V.F. *Bol'shoj praktikum po fotosintezu* [Large workshop on photosynthesis]. Ed. Ermakova I.P. Moscow. Izdatel'skij centr «Akademiya», 2003, 256 p. (In Russian)
9. Elizarova V.A. *Soderzhanie fotosinteticheskikh pigmentov v fitoplanktone vodoemov raznogo tipa* [The content of photosynthetic pigments in phytoplankton of reservoirs of various types]. Abstract of Ph. D. thesis. Moscow, 1975, 24 p. (In Russian)

Received 10 October 2019