

УДК 582.26

ЗАСТОСУВАННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ ДЛЯ ОПТИМІЗАЦІЇ МІНЕРАЛЬНОГО ЖИВЛЕННЯ ЗА ПРОМИСЛОВОГО КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРОСКОПІЧНИХ ВОДОРОСТЕЙ

Т.В. ПАРШИКОВА, В.О. ТРЕТЯКОВ, О.В. ПАЦКО

*Київський національний університет імені Тараса Шевченка
01033 Київ, вул. Володимирська, 60*

Проаналізовано й узагальнено світовий досвід з оптимізації складу поживних середовищ за індустріального культивування промислово цінних видів мікроскопічних водоростей з урахуванням основних фізіологічно необхідних мікроелементів (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, B) та наявних у фотобіореакторах супутніх елементів (Cd, Ni, Cr, V, W, Al). Обговорено оптимальні для росту й розвитку мікроскопічних водоростей діапазони концентрацій мікроелементів, чинники, які можуть сприяти розширенню або звуженню їхніх меж. Показано, що недостатня забезпеченість мікроелементами крім зниження продуктивності призводить до характерних морфологічних змін клітин мікроскопічних водоростей. Доведено необхідність регулювання забезпечення останніх мінеральними елементами для здійснення спрямованого біосинтезу різних біологічно активних речовин та досягнення високої продуктивності вирощуваних у промислових масштабах культур.

Ключові слова: мікроскопічні водорості, поживне середовище, мікроелементи, супутні речовини.

Сучасний світовий досвід підтверджує, що важливим додатковим джерелом цінної природної сировини для технічного, кормового, харчового, косметичного, лікувально-профілактичного й фармакологічного застосування (імуномодулятори, антиоксиданти, протизапальні агенти, бактерицидні препарати) стає біомаса мікроскопічних водоростей, які вирощують у спеціалізованих фотобіореакторах [4, 11, 15, 17, 24]. В останнє десятиліття їх вважають також найперспективнішою сировиною для виробництва біодизеля. Підраховано, що з 1 га земельних угідь можна отримати 446 л соєвої олії або 2690 л пальмової, а з такої ж площі водної поверхні — до 90 000 л біодизеля [21, 22]. Експериментально підтверджено перспективність використання добрив на основі водоростей (альгалізація, сидерація, альгобактеріальні композиції) для підтримання й поліпшення родючості ґрунтів, підвищення врожайності сільськогосподарських культур [2, 6, 16]. Особливо необхідні добрива на основі водоростей в умовах зрошувального землеробства, оскільки їхні гідрофільні комплекси утримують вологу і зменшують витрати води [16, 20].

Перспективи використання мікроскопічних водоростей пов'язані з потребою вирішення низки проблем їх культивування, в тім числі детальної розробки питань мінерального живлення макро- та мікроелементами як чинника, що великою мірою визначає продуктивність і напрям метаболізму цих культур. На відміну від традиційного сільського госпо-

дарства, коли насіння рослин висівають у ґрунт, в якому в тій чи іншій кількості є всі елементи живлення і здебільшого контролюють лише вміст деяких біогенних елементів (азоту, фосфору, калію), для інтенсивного вирощування мікроскопічних водоростей у промисловій культурі й подальшого використання їхньої біомаси винятково важливе значення має склад поживного середовища. В ньому розчиняють весь комплекс необхідних для рослини солей, однак ці сполуки не залишаються незмінними: вони реагують між собою, випадають в осад, стають недоступними для рослини, зв'язують той чи інший елемент. Оскільки поживне середовище є найголовнішим чинником формування продуктивності мікроводоростей у промисловій культурі, у 1970—1980-х роках, виконавши величезний обсяг експериментальних робіт та узагальнивши всі наявні в літературі дані, відомий учений В.В. Упітіс та його учні з Інституту біології АН Латвійської РСР сформулювали основні закони оптимізації мінерального живлення мікроводоростей [13]. Основним модельним об'єктом досліджень латвійської наукової школи була зелена водорість *Chlorella* — перший рослинний космонавт і підводник, яка досі залишається найпопулярнішим об'єктом промислового фотосинтезу в більшості країн Європи, Азії, Америки. В наступні роки на базі розроблених законів оптимізації, що визначали кількісні потреби мікроводоростей в основних фізіологічно необхідних мінеральних елементах і чинники, які сприяли розширенню або звуженню діапазону їх оптимальної концентрації, взаємодію елементів (антагонізм чи синергізм), можливості використання цих складових для зниження токсичності надлишку окремих елементів, у різних лабораторіях світу проводили роботи зі створення збалансованих за макро- й мікроелементами поживних середовищ для інших видів мікроскопічних водоростей різних систематичних груп, таких як *Spirulina*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Porphyridium* та багатьох інших [1, 5, 7, 8, 12]. Було сконструйовано спеціальні лабораторні установки [14, 23], що давали змогу в автоматизованому режимі добирати оптимальні концентрації мінеральних елементів у поживному середовищі, вивчати особливості росту й розвитку промислово цінних штамів мікроскопічних водоростей за різних режимів культивування.

Для промислового фотосинтезу мікроскопічних водоростей весь комплекс мінеральних елементів поділяють на три групи: до першої входять такі макроелементи, як N, Ca P, K, Mg, S; до другої — основні фізіологічно необхідні мікроелементи — Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, B; до третьої — так звані супутні елементи, які містяться в системах культивування, оскільки вода є ідеальним розчинником і переводить у розчинний стан багато різних речовин, створює передумови для їх накопичення в біомасі. До супутніх належать такі елементи, як Cd, Ni, Cr, V, W, Al, Pb, Sn, F, As, Se, Hg, Sr, Cs, Zr та деякі інші.

Щоб правильно оптимізувати поживне середовище, треба знати потребу організму в тих чи інших елементах живлення. Особливу увагу в останні роки приділяють вивченню мінеральних елементів, необхідних для нормального розвитку мікроскопічних водоростей у дуже незначній кількості — мікроелементів. Нині мікроелементи досліджують у таких напрямках: визначення толерантності мікроскопічних водоростей до високої концентрації мікроелементів та умов, за яких вона може підвищитись, з'ясування їхньої функції у ферментативних реакціях, обміні регуляторів росту і вітамінів, у структурній організації клітин, органел,

біополімерів. На підставі цих досліджень розробляють методи діагностики і критерії забезпеченості мікроскопічних водоростей мікроелементами для оцінювання режиму мінерального живлення за різних умов культивування й істотного підвищення продуктивності фотосинтезуючих організмів [19, 20]. Коротко проаналізуємо найважливіші відомості щодо ролі основних мікроелементів у живленні основних індустріальних культур водоростей.

Залізо — один із перших мікроелементів, важливість якого була доведена для мікроорганізмів [3]. Метаболічно активні форми заліза входять до складу ферментів — каталази, пероксидази, цитохромоксидази, різних форм цитохромів, негемінових залізопротейдів (ферредоксин, залізофлавопротейди). Залізозмісні білки беруть участь в окисно-відновних реакціях фотосинтезу, дихання, вуглеводного обміну, фіксації молекулярного азоту [4, 6, 7, 16]. Негемінові форми заліза й молібден входять до складу активного центру нітрогенази, що каталізує відновлення молекулярного азоту в процесі азотфіксації в бактеріодах корневих бульбочок [13]. Показано, що низькомолекулярний ферредоксин бере участь практично в усіх біохімічних реакціях хлоропластів [16].

За дефіциту заліза ріст мікроводоростей гальмується, фотосинтез знижується, з'являється хлороз. Вважають, що дефіцит заліза впливає насамперед на організацію пігментних молекул у реакційних центрах фотохімічних систем. При цьому сповільнюються оформлення тилакоїдів і збирання їх у гранули. У хлоропластах міститься близько половини усього заліза, в основному у зв'язаному стані [13, 16]. Експериментально підтверджено, що залізо активно поглинається на світлі й корелює за динамікою цього процесу із синтезом хлорофілу та інших пігментів. За гострого дефіциту заліза різко гальмується ріст, розвиваються дрібні клітини з низьким вмістом хлорофілу [13]. Кількісна потреба мікроскопічних водоростей у залізі більша, ніж в інших мікроелементах. Для утворення 1 кг сухої біомаси хлорели потрібно 30 мг заліза [13], однак для інтенсивного росту культури цього мало.

Найчастіше концентрацію заліза у вигляді сульфату, хлориду або цитрату [13] в поживному середовищі підтримують у межах 0,2—0,8 мг/л. За інтенсивного росту хлорели її потрібно збільшити до 2—5 мг/л. Низька зелених й синьозелених водоростей нормально розвивається за концентрації цього елемента у середовищі 0,15—1,5 мг/л. Екстремальні дози заліза — в межах 16—60 мг/л [13, 16].

Вплив заліза на мікроскопічні водорості великою мірою залежить від рН: у разі підкислення проникність цитоплазми для його іонів зменшується, однак через кращу розчинність сполук заліза його дія посилюється; у разі підлуження середовища, навпаки, проникність цитоплазми для іонів заліза збільшується, але водночас зростає осадження його сполук і воно стає менш доступним для водоростей. За реакції, близької до нейтральної, залізо частково зв'язується з утворенням фосфату, а також сорбується фосфатом кальцію і стає важкодоступним для клітин хлорели [13]. Для запобігання осадженню фосфатів заліза останнє краще використовувати у вигляді гліцерофосфатів. У цьому разі залізо залишається в розчинній формі навіть за наявності в поживному середовищі кальцію. Добрим джерелом заліза вважають також фериціанід калію концентрацією до 20 мг/л у розрахунку на елемент, причому його дія мало залежить від рН середовища [16]. Цю сполуку застосовують частіше, ніж цитрат і сульфат заліза. Для запобігання осадженню заліза в нейтрально-

му поживному середовищі рекомендовано застосовувати цитрат натрію у кількості 10 мг на 5 мг заліза.

На поведінку заліза в розчині може істотно впливати етилендіамінтетраацетат натрію (ЕДТА), який обов'язково додають у середовище для підтримання його стабільності. Встановлено [13], що дія Na_2EDTA залежить від вмісту в середовищі заліза. За гострого дефіциту заліза й наявності ЕДТА ріст хлорели пригнічується, за часткового забезпечення залізом залежно від кількості Na_2EDTA (30 або 100 мг/л) — поліпшується або гальмується, за оптимальної кількості заліза (5 мг/л) в поживному середовищі Na_2EDTA не впливає на ріст водоростей. Вважають, що внесення в поживне середовище 30—40 мг/л Na_2EDTA сприяє ефективнішому засвоєнню заліза клітинами хлорели [13].

Вміст заліза в біомасі залежить від його концентрації в поживному середовищі. Зазвичай його вміст у біомасі не перевищує 150 мг/кг абсолютно сухої речовини (АСР). За достатньої кількості цього елемента в середовищі (5—50 мг/л) його вміст у біомасі коливається в межах 200—1000 мг/кг [13].

Важливо зазначити, що залізо впливає на вміст інших елементів у біомасі хлорели. Експериментально підтверджено, що за максимальної концентрації заліза (25—50 мг/л) помітно знижується вміст фосфору, мангану, а також цинку, міді й магнію в біомасі хлорели. Антагоністична дія заліза виявляється і в ефективному зниженні токсичності міді підвищеної концентрації. Доведено, що ця залежність підтверджується й за кількості заліза, у 80—120 разів більшої за вміст міді в поживному середовищі [9]. Залізо зменшує також токсичний вплив низки супутніх елементів, ефективно знижує токсичність для хлорели хрому, вольфраму, ванадію, кадмію, що важливо для нормального росту водоростей. Багато вчених експериментально довело, що жоден інший із фізіологічно необхідних мікроелементів не має такої універсальної антагоністичної дії, як залізо [13, 16, 18].

Отже, встановлено, що більшість мікроскопічних водоростей стійкі до наявності заліза в середовищі й гірше витримують його дефіцит, ніж високі концентрації. Наприклад, такі культури, як *Spirulina platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Cyanidium caldarium*, *Ankistrodesmus braunii*, *Microcystis* sp., *Chlamydomonas reinhardtii* нормально ростуть і розвиваються за концентрації заліза в поживному середовищі 20—25 мг/л [13].

Манган — мікроелемент, необхідний для росту і розвитку як водоростей, так і супутніх організмів — грибів та бактерій [6, 8, 13, 16]. За його дефіциту крім гальмування росту відбуваються морфологічні зміни в клітинах, пригнічується фотосинтез, оскільки він бере безпосередню участь у фотохімічних процесах, сповільнюється виділення кисню [3, 10]. У цих умовах порушується і структура хлоропластів: зменшуються міжгранні ламели, частина з них перетворюється на пухирці, у стромі з'являються порожнини, диски гран виявляють тенденцію до руйнування. Дефіцит мангану призводить до світлоруйнування хлорофілу, що може спричинити хлороз як вторинний симптом нестачі мангану за високої освітленості. У водоростей, які не містять гідрогенази (*Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*), нестача мангану викликає хлороз. Показником дефіциту цього елемента є зниження вмісту вуглеводів.

Мінімальними концентраціями мангану для біосинтезу 1 кг біомаси одні автори вважають 2,5, інші — до 69 мг/л [4, 13, 16]. Різкого переходу від оптимальних до токсичних його концентрацій не виявлено. На-

приклад, хлорела оптимально росте за вмісту 0,04—0,5 мг/л мангану, за 4 мг/л її ріст поступово пригнічується, але повністю не інгібується навіть за концентрації мангану 40 мг/л.

Застосування хелатуючого агента — Na_2EDTA концентрацією 30—60 мг/л розширює діапазон оптимальних концентрацій мангану до 40 мг/л поживного середовища. В міру збільшення вмісту цього елемента в поживному середовищі підвищується його концентрація і в біомасі, причому вона може досягати 1700 мг/кг біомаси. Водночас у біомасі зменшується вміст цинку.

Отже, манган — малотоксичний елемент для хлорели. Його вміст у біомасі водорості 30—80 мг/кг АСР засвідчує нормальне забезпечення ним клітин. Симптоми голодування водоростей на манган виявляються за його вмісту в клітинах менш як 30 мг/кг АСР [13].

Дослідженням впливу заліза і мангану, кобальту й молібдену, а також їх взаємодії на ріст зеленої водорості *Platimonas viridis* Rouch в умовах проточної культури встановлено, що для інтенсивного росту цього організму важливий не тільки вміст мінеральних елементів у застосованому для індустріального культивування поживному середовищі, а й їх співвідношення. Максимальні показники росту водорості зафіксовано за співвідношення концентрацій $\text{Mn} : \text{Co} : \text{Mo}$ близького до 5,0 : 2,5 : 2,0. За його зміни продуктивність культури зменшується [16].

Мідь у мікрowodоростях відіграє важливу роль у реакціях фотосинтезу. На відміну від мангану, вона більше впливає на фоторедукцію, ніж на реакцію Хілла [13]. Участь міді в реакціях фотосинтезу пов'язують із тим, що вона входить до складу цитохромоксидази. Значна частина цього елемента міститься у низькомолекулярному білку каталітичної дії — пластоціаніні, який уперше був ізольований саме з хлорели [19]. Токсичність високих концентрацій міді пов'язують з пригніченням фотосинтезу, особливо за високої інтенсивності світла. За слабого освітлення токсичність виявляється пізніше, звідки роблять висновок, що депресія фотосинтезу за наявності міді спричинюється накопиченням у клітинах хлорели продуктів асиміляції [3, 13].

Для водоростей мідь потрібна у дуже низьких концентраціях, як домішка до солей. Симптоми нестачі міді виявляються у хлорели за її концентрації, нижчої від 0,006 мг/л. Ріст більшості зелених водоростей не пригнічується за концентрації міді 0,06—0,70 мг/л. Найчутливіші до вмісту міді синьозелені водорості (ціанобактерії), розвиток яких припиняється за концентрації цього елемента 0,1—0,2 мг/л [9], ріст хлорели пригнічується за 0,25—0,50 мг/л, діатомових водоростей — за її концентрації 0,25 мг/л. Найстійкішим до дії міді є *Scenedesmus*, що витримує її концентрації до 1,0 мг/л [3]. Оптимальною для хлорели вважають концентрацію міді 0,01—0,10 мг/л, за підвищення її до 1,0 мг/л ріст хлорели пригнічується повністю [13].

Експериментально виявлено складну поведінку міді в розчинах [3, 9, 13]. По-перше, вона існує у 8 різних формах, серед яких найтоксичнішою є іонна. По-друге, в нейтральному середовищі вона осаджується або утворює з клітинними метаболітами розчинні комплексні сполуки. Фосфати за рН 5,1 осаджують частину міді, а за рН 5,9 повністю вилучають її з розчину. Карбонат натрію за рН 8,4 також повністю осаджує мідь. Однак випадання в осад не знижує її токсичності. Менш токсичною є мідь у складі комплексних сполук. Наприклад, *Euglena gracilis* виділяє в середовище глікопептид, який виконує роль хелату міді й цинку,

внаслідок чого водорість зберігає нормальну швидкість росту за концентрації міді до 10 мг/л [16].

Знижує токсичність міді також ЕДТА. Багато авторів відмітило значну роль заліза у виявленні токсичності міді [3, 9]. За низького вмісту заліза (0,06 мг/л) токсичність міді щодо хлорели може виявлятися навіть за низької її концентрації (0,001 мг/л). З підвищенням вмісту заліза токсичність надмірних кількостей міді для хлорели знижується, що пов'язують зі зменшенням її активної концентрації внаслідок адсорбції на міцеллах $\text{Fe}(\text{OH})_3$, особливо в нейтральному і лужному поживному середовищі [3]. Доведено, що в анаеробних умовах токсичність міді підвищується, що не характерно для інших важких металів [3, 9, 13]. Деякі автори пов'язують токсичність міді з її негативним впливом на мембрани клітин, внаслідок чого збільшується їх проникність для іонів калію [3, 20].

За низького вмісту міді в поживному середовищі в біомасі її накопичується 0,5—2,0 мг/кг [13]. З підвищенням концентрації міді в середовищі до 0,3 мг/л її вміст у біомасі зростає до 70—100 мг/кг АСР. Накопичення міді менш як 2 мг/кг свідчить про її дефіцит. Нормальний ріст хлорели відповідає вмісту міді в біомасі 4—10 мг/кг, більший — свідчить про ефект токсичності.

На прояв токсичності міді істотно впливає густина суспензії: чим більше число клітин у суспензії водоростей, тим за вищих концентрацій виявляється її токсичність. Наприклад, за числа клітин 10 000/мл мідь токсична вже за концентрації 0,1 мг/л, якщо число клітин 100 млн/мл, мідь токсична лише за концентрації 3,0 мг/л [9]. Токсичність цього елемента зростає за $\text{pH} < 7,0$ й $\text{pH} 8,0$ — $9,0$.

Отже, мідь у малих концентраціях необхідна для нормального росту водоростей, за підвищення вмісту виявляється її токсичність, причому інтервал діючих концентрацій міді значно вужчий, ніж інших мікроелементів. При визначенні її оптимальних концентрацій для конкретного виду водорості треба враховувати такі чинники, як pH , співвідношення інших елементів у складі середовища, наявність хелатів, що знижують її токсичність, густина культури водорості. Наприклад, співвідношення міді і заліза має знаходитись у межах 1 : 80 — 1 : 100 [13]. Для очищення культури хлорели від інших видів водоростей концентрацію міді доводять до 1—5 мг/л.

Цинк входить до складу ферментів, які регулюють фосфорний, вуглеводний, білковий обміни, інтенсивність фотосинтезу, окисно-відновний потенціал у клітинах. Вміст його у складі ферментів — 0,2—0,3 % [13]. Серед понад 40 ферментів, що містять цинк, широко представлені гідролази й оксидоредуктази. Цинк інтенсифікує біосинтез нуклеїнових кислот, впливає на активність ферментів нуклеїнового обміну, діє як стабілізатор різних біологічних мембран [9] (зв'язується в останніх сильніше, ніж залізо, кадмій, кобальт і мідь).

Для нормального росту багатьох зелених водоростей концентрація цинку в поживному середовищі має становити 0,08—4,0 мг/л. Ріст хлорели не пригнічується за підвищення концентрації цинку до 25—130 мг/л, хоча мікроцистис гине вже за 0,2 мг/л. Оптимальна концентрація цинку для хлорели — 0,04—1,0 мг/л. ЕДТА підвищує цей рівень — він зв'язує цинк і захищає клітини від токсичної дії металу. За наявності хелатуючого агента Na_2EDTA верхня межа оптимальної концентрації цинку в поживному середовищі досягає 20 мг/л. Визначено, що в біомасі хлорели цинку міститься 20—30 мг/кг АСР [13]. Підвищення концентрації

цинку позитивно впливає на поглинання водорістю фосфору. Встановлено, що для отримання 1 кг АСР біомаси потрібно 5–7 мг/л цинку [13]. Однак інтенсивні культури хлорели його потребують більше, тому концентрація нижча ніж 15 мг/л обмежує ріст культури. За збільшення вмісту цинку в середовищі його концентрація в біомасі водоростей може досягати 3200 мг/кг АСР [13].

Молібден — незамінний для фіксації атмосферного азоту й відновлення нітратів. У культурі синьозеленої водорості *Nostoc muscorum* за нестачі молібдену клітини мають жовтувато-зелений колір. Для фіксації молекулярного азоту водорості потрібно 4,8 мкг/л молібдену, в разі живлення її нітратами — у 1000 разів менше [3].

Роль молібдену в життєдіяльності зелених водоростей полягає у відновленні нітратів, оскільки він входить до складу нітратредуктази, яка каталізує процес відновлення нітратів до нітритів. Наприклад, найбільш молібденолюбна водорість *Scenedesmus* за вирощування її на поживному середовищі з додаванням нітратів потребує не менш як 2000–3000 атомів молібдену на 1 клітину [3]. Поділ клітин припиняється, коли вміст молібдену знижується до 1500 атомів на клітину. Для забезпечення повноцінної активності нітратредуктази мікрowodоростей достатня концентрація молібдену 0,048–0,480 мкг/л [6]. За відсутності молібдену в клітинах виявляються ознаки голодування на азот, оскільки водорості не здатні відновлювати нітрати до нітритів і синтезувати амінокислоти та білки. В разі заміни нітратів на амонійний азот або сечовину водорості не відчувають дефіциту молібдену [6].

Повноцінний ріст хлорели забезпечують дуже низькі концентрації молібдену (0,01 мг/л), вищі його концентрації не впливають негативно. Молібден накопичується і в біомасі водорості. Так, за нормальної концентрації молібдену в поживному середовищі його вміст у клітинах становить 0,4–0,6 мг/кг сухої речовини, за високої — досягає 3,0–8,3 мг/кг. Доведено, що в культурах із концентрацією клітин 100 млн/мл молібден нетоксичний навіть за концентрації 500 мг/л [13].

Кобальт у клітинах мікроорганізмів виконує низку специфічних і неспецифічних функцій. Він незамінний у складі вітаміну В₁₂, кобаламідних коензимів, деяких інших сполук.

Доведено роль кобальту в розвитку синьозелених водоростей (ціанобактерій). Вже за концентрації 0,002 мкг/л він на 58 % інтенсифікує їх ріст. Щодо зелених водоростей відомо, що кобальт у межах 0,01–0,50 мг/л практично не впливає на ріст, наприклад, хлорели. Пригнічення починає виявлятися за його концентрації понад 1,0 мг/л. Однак лише за концентрації кобальту 50–100 мг/л продуктивність культури знижується на 50 % і більше відносно норми. Чутливішою щодо кобальту виявилась червона водорість *Cyanidium caldarum*, яка росте в кислому середовищі. За 0,05–0,10 мг/л продуктивність культури підвищується, однак за концентрації кобальту 0,5–1,0 мг/л — дуже пригнічується.

Токсичність кобальту пов'язують з високою здатністю до накопичення в клітинах за підвищення його концентрації в середовищі. Наприклад, за низького вмісту кобальту в середовищі його кількість у біомасі становить 4–10 мг/кг АСР, за вмісту в межах 30–100 мг/л, що викликає пригнічення росту культури на 20–50 %, у біомасі кобальту накопичується 700–900 мг/кг [13].

У разі підвищення вмісту кобальту в поживному середовищі від 0 до 50 мг/л у 4 рази зменшується вміст хлорофілу, від 51 до 42 % — кількість білка, майже в 4 рази — накопичення сухої речовини [13]. Додавання хе-

лату ЕДТА не знижує токсичність кобальту. У літературі є багато даних щодо прояву кобальтом антагонізму до іонів магнію і заліза [3, 13, 16].

Бор — необхідний мікроелемент для вищих рослин, але його вплив на водорості вивчено мало. Багато водоростей однаково росте як на середовищі з бором, так і без нього, з поживного середовища клітини водоростей поглинають різні кількості бору [3]. Наприклад, за вмісту бору в середовищі 10 мг/л хлорела поглинала його не більш як 1,1—2,7 мг/кг АСР, за 50 мг/л — у сухій біомасі водорості вміст бору зростав до 15,0 мг/кг.

Крім розглянутих вище фізіологічно необхідних мікроелементів до складу поживних середовищ за індустріального культивування мікроскопічних водоростей входять супутні елементи, найчастіше кадмій, нікель, хром, алюміній, ванадій, вольфрам та ін. Наявність їх у фотобіореакторах пов'язують з використанням складних поживних середовищ (відходи харчової промисловості, стічні води тощо), а також із вилуженням мікроелементів з матеріалів культиваторів. Оскільки супутні елементи можуть інгібувати ріст культур та акумулюватись у великій кількості в біомасі мікроскопічних водоростей, використання вирощеної за таких умов біомаси як харчового й лікувального продукту неприпустиме.

Доведено, що **кадмій** токсичний для хлорели навіть за низьких концентрацій. За вмісту 1—2 мг/л і початкової густини суспензії водорості 3—5 млн кл/мл він не виявляє інгібувальної дії, а за концентрації 5 мг/л явно пригнічує її ріст, спричинює зниження кількостей білка і хлорофілу в клітинах. За вмісту кадмію в поживному середовищі 8—10 мг/л клітини водорості поступово знебарвлюються і гинуть. Якщо в поживному середовищі міститься 0,05—5 мг/л кадмію, поглинання його клітинами хлорели поступово зростає з 9 до 730 мг/кг АСР [13].

Хром — елемент із вузькою межею допустимих для хлорели концентрацій у поживному середовищі й високою токсичністю в разі їх перевищення. За його концентрації понад 0,5 мг/л ріст хлорели помітно пригнічується, особливо на початку культивування. Інгібування росту культур токсичними концентраціями хрому (5 мг/л) виявляється в порушенні біосинтезу білка, внаслідок чого його вміст зменшується вдвічі порівняно з контрольним варіантом, знижується вміст хлорофілу. Поглинання хрому клітинами хлорели за його вмісту в поживному середовищі 5 мг/л досягає 250 мг/кг сухої речовини.

Нікель інгібує ріст клітин хлорели навіть за низької концентрації — 1 мг/л, зменшує продуктивність культури на 35 %, а його концентрація 10—30 мг/л — летальна для мікроскопічних водоростей. Характерно, що токсичність нікелю може виявлятися не відразу після його надходження в поживне середовище, а лише через 2—3 доби. Цим він відрізняється від міді та кадмію, підвищені концентрації яких сильно пригнічують ріст і спричинюють загибель хлорели відразу після внесення токсичних концентрацій цих елементів у поживне середовище. Показано, що культури, які на початковому етапі розвитку витримували надлишок міді і кадмію, в подальшому не гинуть, а нерідко досягають продуктивності культур, вирощуваних у контрольних варіантах (без цих елементів у поживному середовищі). За збільшення концентрації нікелю в середовищі від 0,01 до 5 мг/л його поглинання клітинами хлорели зростає з 3 до 250 мг/кг АСР.

Ванадій у широкому діапазоні концентрацій не чинить сильної токсичної дії на хлорелу, однак за його концентрації 0,1 мг/л продуктивність культури поступово зменшується: за 1 мг/л — незначно, за 50 мг/л — на 25 %, за вмісту ванадію 100 мг/л її ріст знижується на 35 % порівняно з контрольним варіантом. Малу токсичність ванадію

підтверджує той факт, що на відміну від нікелю, хрому і кадмію за підвищення його концентрації не руйнується пігментна система хлорели і вміст білка й вуглеводів помітно не змінюється. У клітинах хлорели ванадію накопичується менше, ніж інших супутніх елементів.

Малотоксичним супутнім мікроелементом можна вважати й **вольфрам**. Лише за концентрацій 30 і 50 мг/л він інгібує ріст хлорели, її біомаса зменшується майже вдвічі. За підвищеної концентрації вольфраму в поживному середовищі накопичення білка й вуглеводів у біомасі хлорели змінюється неістотно, це впливає лише на вміст хлорофілу.

Оскільки **алюміній** та його сплави широко використовують у конструкціях промислових фотобіореакторів, під час культивування мікроскопічних водоростей він може вилужуватись із конструкцій культиваторів і надходити в поживне середовище. За безперервного культивування алюмінію у клітинах хлорели може накопичуватись до 50 мг/кг АСР. Комплексом експериментів виявлено незначне інгібування росту водорості і зменшення вмісту білка в клітинах за концентрації алюмінію 50 мг/л. За вмісту алюмінію в середовищі 10–50 мг/л різні штами хлорели накопичували його в кількості 300–2000 мг/кг АСР [13].

Отже, розглянувши роль фізіологічно необхідних і супутніх мікроелементів у регулюванні продуктивності культур мікроскопічних водоростей, зазначимо, що розробка режиму мінерального живлення для кожного виду — це копітка і тяжка праця, оскільки оптимальні для росту концентрації мікроелементів не є сталими, а залежать від багатьох чинників: густини суспензії клітин, рН поживного середовища, наявності хелатуючих агентів, інтенсивності освітлення тощо. Основні фізіологічно необхідні мікроелементи — залізо, манган, цинк, мідь, молібден за оптимальних умов культивування поглинаються клітинами водоростей у співвідношеннях, близьких до $100 \dots 250 : 10 : 2 : 1 : 0,5$ і утворюють спадну послідовність $Fe > Mn > Zn > Cu > Mo$. Збереження цих співвідношень у поживному середовищі багаторазово розширює діапазон оптимальних для мікроскопічних водоростей концентрацій мікроелементів.

Потреба хлорели у макро- й мікроелементах на одиницю продукуюваної біомаси за культивування на збалансованому за всіма елементами мінерального живлення поживному середовищі становить: N — 80–100, K — 6–8, P — 8–10, Mg — 4–5, S — 5–6 г на 1 кг АСР; Fe — 300–400, Zn — 20–30, Mn — 30–50, Cu — 4–5, Mo — 0,4–0,6, B — 0,2–0,5 мг/кг. Згідно з експериментальними дослідженнями [9, 13, 16, 18, 19], потреба в макро- і мікроелементах інших промислово цінних видів мікроскопічних водоростей (*Spirulina platensis*, *Cyanidium caldarium*) близька до потреб хлорели, тому отримані дані можна використовувати під час їх індустріального культивування, незважаючи на істотну різницю для них фізіологічного оптимуму рН: *Chlorella* — 5–8, *Spirulina platensis* — 9–11, *Cyanidium caldarium* — 1–3. Для інших видів мікроскопічних водоростей за недостатнього забезпечення їх мікроелементами разом зі зниженням продуктивності можуть відбуватися характерні морфологічні зміни клітин.

За індустріального культивування мікроскопічних водоростей разом із необхідними мікроелементами треба ретельно контролювати концентрацію супутніх мікроелементів (Cd, Ni, Cr, V, W, Al) у поживному середовищі, оскільки вона може збільшуватись унаслідок вилуження з матеріалів фотобіореакторів або з домішок компонентів середовища.

Токсичними для мікроскопічних водоростей є кадмій, нікель і хром, оскільки в концентраціях до 10 мг/л поживного середовища пригнічують ріст культур, порушують пігментну систему й біосинтез білка. Малотоксичні — ванадій, вольфрам, алюміній, вони мало пригнічують ріст і фізіологічні функції клітин мікроскопічних водоростей у концентраціях до 50 мг/л. Важливо зазначити, що за низького забезпечення поживного середовища фізіологічно необхідними мікроелементами токсичність супутніх елементів (Cd, Ni, Cr) виявляється за нижчих їх концентрацій у середовищі. Збільшення в поживному середовищі загальної кількості необхідних мікроелементів за збереження їх оптимального співвідношення — універсальний спосіб підвищення стійкості мікроскопічних водоростей за надлишку супутніх мікроелементів у середовищі.

Здатність мікроскопічних водоростей акумулювати в біомасі значні кількості деяких мікроелементів (Fe, Cu, Zn) та виявлена специфіка толерантності до підвищених їх концентрацій може бути основою раціонального використання окремих видів у системах біологічного очищення промислових стоків, які містять важкі метали. Оскільки універсальні поживні середовища можна використовувати для музейного культивування певних груп мікроскопічних водоростей, не зникла потреба розробки нових збалансованих поживних середовищ, які б максимально задовольняли потреби нових перспективних штамів-продуцентів.

Отже, регулювання забезпечення мікроскопічних водоростей мінеральними елементами — одна з необхідних умов певного спрямування біосинтезу окремих біологічно активних речовин для досягнення високої продуктивності вирощуваних в індустріальних масштабах культур.

1. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Жила Н.О., Плотников В.Ф. Исследование физиолого-биохимических свойств зеленой водоросли *Volvox globatorum* // Докл. РАН. — 1998. — 361, № 2. — С. 256—259.
2. Гольдин Е.Б., Сиренко Л.А. Синезеленые водоросли как продуценты природных пестицидов // Альгология. — 1998. — 8, № 1. — С. 93—104.
3. Дмитриева А.Г., Кожанова О.А., Дронина Н.Л. Физиология растительных организмов и роль металлов. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 2002. — 160 с.
4. Золотарова О.К., Шнюкова Е.И., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективы використання мікрводоростей у біотехнології. — К.: Альтерпрес, 2008. — 235 с.
5. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. — М., Ин-т физиологии растений РАН, 1991. — 227 с.
6. Костяев В.Я. Синезеленые водоросли и эволюция эукариотных организмов. — М.: Наука, 2001. — 125 с.
7. Масюк Н.П., Посудин Ю.И., Лилицкая Г.Г. Фотодвижение клеток *Dunaliella* Teod. (*Dunaliellales*, *Chlorophyceae*, *Viridiplantae*). — Киев: Академперіодика, 2007. — 265 с.
8. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Л.А. Сиренко, А.А. Сакевич, Л.Ф. Осипов и др.; Отв. ред. А.В. Топачевский. — Киев: Наук. думка, 1975. — 247 с.
9. Налимова А.А., Попова В.В., Цоглин Л.Н., Пронина Н.А. Влияние меди и цинка на рост и аккумуляцию клетками *Spirulina platensis* тяжелых металлов // Физиология растений. — 2005. — 52, № 2. — С. 259—265.
10. Основы альгосозологии / Отв. ред. Н.В. Кондратьева, П.М. Царенко. — Киев: Академперіодика, 2008. — 480 с.
11. Пульц О. Пути пополнения пищевых ресурсов за счет использования водорослей // Альгология. — 2000. — 10, № 3. — С. 341—349.
12. Сиренко Л.А., Рыбак Н.В., Паршикова Т.В., Пахомова М.Н. Коллекция живых культур микроскопических водорослей (акроним коллекции HPDP). — Киев: Укр. фитосоциологический центр, 2005. — 54 с.
13. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / Отв. ред. А.Ф. Ноллендорф. — Рига: Зинатне, 1983. — 240 с.
14. Цыганков А.А. Лабораторные фотобиореакторы // Приклад. биохимия и микробиология. — 2001. — 37, № 4. — С. 387—397.

15. *Apt K.E., Behrens P.W.* Commercial developments in microalgal biotechnology // *J. Phycol.* — 1999. — **35**, N 2. — P. 215—226.
16. *Barsanti L., Gualtieri P.* *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology.* — Boca Raton: CRC Press, 2005. — 320 p.
17. *Becker W.* Microalgae in human and animal nutrition // *Handbook of Microalgal Culture / Ed. A. Richmond.* — Oxford: Blackwell, 2004. — P. 312—321.
18. *Fox R.D.* Spirulina. Production and potential. — Aix-en-Provence: Editions Edisud, 1996. — 232 p.
19. *Gordon J.M., Polle J.E.W.* Ultrahigh bioproductivity from algae // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2007. — **76**, N 5. — P. 969—975.
20. *Gupta M.N., Raghava S.* Relevance of chemistry to white biotechnology // *Chem. Cent. J.* — 2007. — **1**, N 1. — P. 1—17.
21. *Hill J., Nelson E., Tilman D. et al.* Environmental, economic and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2006. — **103**, N 30. — P. 11206—11210.
22. *Li X., Xu H., Wu Q.* Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors // *Biotechnol. Bioeng.* — 2007. — **98**, N 4. — P. 764—771.
23. *Pulz Q., Scheibebogen K.* Photobioreactors desing and performance with respect to light energy input // *Engineer. Biotechnol.* — Berlin: Springer-Verlag, 1998. — **59**. — P. 123—152.
24. *Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A.* Commercial applications of microalgae // *J. Biosci. Bioeng.* — 2006. — **101**, N 2. — P. 87—96.

Отримано 21.07.2009

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ МИНЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПРИ ПРОМЫШЛЕННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Т.В. Паршикова, *В.О. Третьяков*, *Е.В. Пацко*

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

Проанализирован и обобщен мировой опыт по оптимизации состава питательных сред при индустриальном культивировании промышленно ценных видов микроскопических водорослей с учетом основных физиологически необходимых микроэлементов (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, B) и содержащихся в фотобиореакторах сопутствующих элементов (Cd, Ni, Cr, V, W, Al). Обсуждены оптимальные для роста и развития микроскопических водорослей диапазоны концентраций микроэлементов, факторы, которые могут способствовать расширению или сужению их пределов. Показано, что недостаточная обеспеченность микроэлементами кроме снижения продуктивности приводит к характерным морфологическим изменениям клеток микроскопических водорослей. Доказана необходимость регулирования обеспечения последних минеральными элементами для осуществления направленного биосинтеза различных биологически активных веществ и достижения высокой продуктивности выращиваемых в промышленных масштабах культур.

USING OF MICROELEMENTS FOR OPTIMIZATION OF MINERAL NUTRITION DURING INDUSTRIAL CULTIVATION OF MICROALGAE

T.V. Parshikova, *V.O. Tretyakov*, *E.V. Patsko*

Taras Shevchenko Kyiv National University
60 Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine

It is reviewed the world experience on optimization of nutritive mediums during mass cultivation of industrially important species of microscopic algae with account of main physiologically necessary microelements (Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Co, B) and accompanying elements, which are presented in photobioreactors (Cd, Ni, Cr, V, W, Al). The optimal for growth and development of microalgae diapasons of microelements concentrations and factors, which may promote to widening or narrowing their ranges are discussed. It is shown, that insufficient providing with microelements results in lowering of productivity and characteristic morphological changes in microalgae cells. It was proved the necessity of regulation for providing of microscopic algae with mineral elements for accomplishment of directed biosynthesis of different biologically active compounds and high productivity for cultures, which are grown in industrial volumes.

Key words: microalgae, nutritive medium, microelements, accompanying elements.