

## ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

В. ЯАСКА

В литературе последних десятилетий имеются данные о том, что химический состав зеленых протококковых водорослей подвергается изменению в зависимости от условий их культивирования, в частности от характера минерального питания [7, 16, 19], спектрального состава, интенсивности и продолжительности освещения [4, 7, 18]. Особенно выраженное влияние на химический состав зеленых водорослей оказывает режим азотного питания. При достаточном питании азотом *Chlorella pyrenoidosa* содержит 45—58% белков и до 20% липидов [16]. В условиях азотного голодания содержание белков в *Chlorella pyrenoidosa* снижается до 5—10% и содержание липидов достигает 70% [7] и даже 85% [16]. Отмечается явная зависимость аминокислотного состава *Chlorella pyrenoidosa* от источника азота [8]. У других видов протококковых водорослей содержание белков и липидов изменяется в зависимости от питания азотом в том же направлении, но в менее выраженной степени [5, 9, 11, 21].

В нашей работе приводятся данные о характере и степени изменения химического состава четырех видов зеленых водорослей после прекращения добавления нитрата калия для азотного питания выращиваемых культур.

### Методика

Исходные культуры. Зеленые водоросли *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb., *Chlorococcum botryoides* Rab. и *Oocystis* sp. были выделены из планктона озера Пангоди (ЭССР) в альгологически чистые культуры методом последовательных пересевов на твердую и жидкую питательные среды. Альгологически чистая культура *Chlorella vulgaris* Weuer получена из кафедры систематики растений и геоботаники Тартуского государственного университета от канд. биол. наук Э. Кукк, кому мы обязаны и за определение видов выделенных нами водорослей.

Условия культивирования. Водоросли выращивались в одном литре питательного раствора в сосудах из органического стекла размерами 40×10×5 см. Культуры освещались круглосуточно двумя батареями люминесцентных ламп типа ДС-40. Интенсивность света на поверхности культур, измеренная пиранометром АС-6979 и термозлементом Козырева с увиолевым куполом, составляла  $0,025 \pm 0,004$  кал/см<sup>2</sup>·мин. Освещаемая поверхность одной культуры составляла 400 см<sup>2</sup>. Культуры перемешивались круглосуточно продуванием через пористые стеклянные фильтры 1,5—2,0 л/мин стерильного воздуха, обогащенного углекислым газом (0,2—0,5%). Культивирование проводили в отдельном помещении, где температура воздуха поддерживалась в пределах 25—29°С.



В качестве основной питательной среды использовали модифицированный раствор Краусса [12], содержащий  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,25 г/л,  $K_2HPO_4$  — 0,25 г/л,  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  — 0,01 г/л, раствор микроэлементов — 1,0 мг/л. В состав раствора микроэлементов входили (в г/л):

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	3,05	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,090
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	4,40	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,078
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,051
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0,20	$NH_4VO_3$	0,023
Трилон Б	7,6		

В течение первых 14 дней культивирования, периодически добавляли для азотного питания нитрат калия в количестве 250 мг/л азота. Для анализов бралось 500 мл культуры, которая заменялась безазотистой основной питательной средой.

### Химические анализы

Сухой вес и зола. Из 50 мл культуры осаждали клетки водорослей центрифугированием со скоростью 2500 об/мин в течение 10 мин, взбалтывали в 50 мл дистиллированной воде и повторно центрифугировали. Далее осадок переносили с 1—2 мл дистиллированной воды в тигли и высушивали до постоянного веса при 105°. Озоление проводилось в муфельной печи при 700°.

Общий азот. Общий азот определили колориметрически реактивом Несслера по модифицированной нами методике Мидлтона [13]. Содержание белков вычисляли умножением процентного содержания общего азота на фактор 6,25.

Из 20 мл культуры переносили клетки водорослей с 1—2 мл дистиллированной воды в мерную кьельдалевскую колбу на 50 мл. Прибавляли 2 мл концентрированной серной кислоты и  $HgO$ , осторожно нагревали до окончания обугливания, охлаждали и добавляли 2—3 капли пергидроля. Сжигали до получения бесцветного раствора и разбавляли дистиллированной водой до метки.

В мерную колбу на 50 мл пипетировали 1—3 мл полученного раствора, содержащего 0,02—0,2 мг азота, добавляли 5,0 мл 0,2%-ного раствора гуммиарабика в 0,3 н. селитровой соли, 5,0 мл реактива Несслера по Мидлтону (9 г йодной ртути и 12 г йодистого калия в одном литре дистиллированной воды) и разбавляли до 40 мл дистиллированной водой. При энергичном встряхивании прибавляли 5,0 мл 4,0 н.  $NaOH$  и разбавляли до метки дистиллированной водой. Фотометрировали на колориметре ФЭК-56 при 403 мкм (светофильтр № 3) в 10 мм кюветах относительно раствора реагентов в использованной дистиллированной воде. По данным Мидлтона [13] концентрация  $NaOH$  в пределах от 0,3 до 0,4 н. не влияет на оптическую плотность.

Углеводы. Содержание углеводов в глюкозных единицах определили колориметрически антроновым методом по Ро [14].

Из 20 мл культуры переносили клетки водорослей с 1—2 мл дистиллированной воды в 50 мл мерную колбу, добавляли 10 мл серной кислоты в соотношении 1:20 и разбавляли дистиллированной водой до метки. В 15 мл центрифугальную пробирку пипетировали 0,2—1,0 мл суспензии водорослей, содержащей 0,05—0,5 мг углеводов, добавляли дистиллированной воды до 1,0 мл и 10 мл 0,1%-ного антронового реактива в серной кислоте в соотношении 2:1, содержащей 1% тиомочевины. Перемешивали стеклянной палочкой и нагревали в течение 15 мин на водяной бане при 95—98°. Пробирки охлаждали водопроводной водой до комнатной температуры, центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин и определяли оптическую плотность нижнего прозрачного синего слоя раствора на колориметре ФЭК-56 при 582 мкм (светофильтр № 7) в 10 мм кюветах относительно раствора реагентов.

Липиды. Содержание липидов определяли весовым методом после прямого омыления клеток водорослей и экстрагирования тетрахлористым углеродом.



Из 50 мл культуры клетки водорослей переносили с 1—2 мл дистиллированной воды в эрленмейеровскую колбу на 50 мл со стеклянным шлифом, добавляли 10 мл 2 н. КОН в 50%-ном этиловом спирте, несколько капель насыщенного раствора пирогаллола в спирте и омыляли в течение 2,5—3 часов при слабом кипении под воздушным холодильником. Охлаждали, подкисляли добавлением 20 мл серной кислоты в соотношении 1:20 и экстрагировали в шарообразной делительной воронке дважды по 20 мл тетрахлористого углерода или смеси петролийного эфира с тетрахлористым углеродом в соотношении 9:1. Для окончательного отделения слоя экстракта от осадка было проведено центрифугирование. Экстракт промывали дистиллированной водой и переносили в взвешенный стеклянный бокс. Растворитель удаляли под тягой (при комнатной температуре), остаток сушили в вакуум-эксикаторе над безводным хлористым кальцием и взвешивали.

Расхождения в параллельных определениях не превышали 5% и в большинстве случаев составляли 1—2%.

### Результаты исследований и их обсуждение

Влияние прекращения добавления нитрата калия к выращиваемым культурам водорослей на их химический состав изучалось нами, как правило, после четырнадцатидневного культивирования при достаточном азотном питании. К этому времени количество использованного водорослями азота составляло 44—80% от внесенного в культуры.

Наши данные, приведенные в табл. 1—4, показывают, что при достаточном питании культур азотом все водоросли характеризовались высоким содержанием белков и низким содержанием липидов. При этом имелись место характерные для каждого вида особенности в содержании белков и углеводов. Клетки водоросли *Scenedesmus quadricauda* содержали около 60% белков и 20—23% углеводов, клетки *Chlorococcum botryoides* — белков 36—40%, углеводов 50% от сухого вещества. Остальные два вида водорослей в отношении белков и углеводов занимали промежуточное положение.

После прекращения добавления азота наблюдалось постоянное снижение содержания белков у всех видов водорослей и накопление липидов или углеводов в зависимости от вида водоросли. *Chlorella vulgaris*, *Chlorococcum botryoides* и *Oocystis* sp. по мере углубления недостатка азота накапливали липиды, содержание которых достигало 40—50% от сухого вещества, а у *Scenedesmus quadricauda* происходило интенсивное накопление углеводов, причем содержание липидов изменялось незначительно.

На основании данных химического состава, интенсивности освещения, продуктивности и калорийности белков, липидов и углеводов [7] вычисляли эффективность использования световой энергии для синтеза органических веществ (табл. 1—4). Максимальные полученные значения эффективности фотосинтеза составляли 5,8—10,5%. По данным литературы эффективность фотосинтеза зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* колеблется в пределах от 2,6 до 24% [20] в зависимости от условий культивирования. Основными путями повышения эффективности фотосинтеза являются селекция высокопроизводительных штаммов водорослей и использование оптимальных условий их культивирования [6]. Продуктивность каждого вида водоросли зависит от многих факторов, в том числе и от состава питательного раствора [1, 10, 17], спектрального состава [2, 18] и интенсивности освещения [3, 15, 17], толщины слоя культуры [3, 6, 17], плотности суспензии водорослей [3] и интенсивности перемешивания [3].



Использованный нами источник освещения по спектральному составу не является оптимальным для получения высокой продуктивности [2, 18]. Вследствие относительно низкой интенсивности освещения, продуктивность явно зависела от интенсивности перемешивания, чем объясняются расхождения в продуктивности параллельных культур.

Характерные сдвиги в химическом составе зеленых водорослей происходили значительно раньше снижения продуктивности, которое наступало лишь при остром недостатке азота и сопровождалось резким снижением содержания хлорофилла. На этом этапе первоначально темно-зеленый цвет культур водорослей у *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus quadricauda* менялся в светло-зеленый, у *Chlorococcum botryoides* и *Oocystis* sp., ввиду накопления красного липоидного пигмента, — в светло-бурый.

Результаты работы указывают на возможность управления обменом веществ зеленых водорослей путем целенаправленного режима азотного питания с целью их выращивания с определенным содержанием белков, углеводов и липидов.

Таблица 1

Влияние режима азотного питания на продуктивность и химический состав зеленой водоросли *Chlorella vulgaris*

Показатели	Культура 1				Культура 2			
	Возраст в днях							
	14	21	28	35	14	21	28	35
Сухой вес, г/л	1,54	2,03	1,43	0,82	1,80	1,79	1,57	0,89
Продуктивность, г/м <sup>2</sup> в сутки	2,75	4,50	1,50	0,35	3,20	3,15	2,40	0,35
Эффективность фотосинтеза, %	4,6	5,8	3,9	0,9	5,5	3,7	5,5	0,9
Общий азот, %	7,67	5,64	3,65	3,04	7,70	5,23	3,56	2,53
Белки, %	47,9	35,2	22,8	19,0	48,1	32,7	22,2	15,8
Углеводы, %	27,6	34,5	35,5	27,4	28,0	37,5	35,0	25,3
Липиды, %	12,8	19,3	39,1	48,0	13,4	19,8	40,2	51,2
Зола, %	7,2	5,3	5,2	3,2	7,0	5,3	5,1	2,7

Таблица 2

Влияние режима азотного питания на продуктивность и химический состав зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda*

Показатели	Культура 1				Культура 2			
	Возраст в днях							
	14	21	28	35	14	21	28	35
Сухой вес, г/л	1,66	2,18	2,60	1,81	1,64	2,12	2,49	1,74
Продуктивность, г/м <sup>2</sup> в сутки	3,0	4,8	5,4	1,8	2,9	4,6	5,1	1,8
Эффективность фотосинтеза, %	4,4	6,3	8,0	2,4	4,2	6,2	7,7	2,4
Общий азот, %	9,45	5,36	2,38	1,58	9,55	5,90	2,41	1,80
Белки, %	59,0	33,5	14,9	9,9	59,6	36,8	15,1	11,2
Углеводы, %	22,5	49,5	73,0	66,0	20,4	42,5	75,0	65,8
Липиды, %	12,7	11,0	14,4	18,3	13,1	11,8	13,9	19,3
Зола, %	7,7	6,2	4,7	4,5	7,7	6,2	4,4	4,0



Таблица 3

Влияние режима азотного питания на продуктивность и химический состав зеленой водоросли *Chlorococum botryoides*

Показатели	Культура 1				Культура 2			
	Возраст в днях							
	14	21	28	35	14	21	28	35
Сухой вес, г/л	2,64	3,21	2,84	1,92	3,43	3,47	2,61	1,44
Продуктивность, г/м <sup>2</sup> в сутки	4,7	6,9	4,4	1,8	6,1	6,2	3,1	0,5
Эффективность фотосинтеза, %	6,8	10,5	8,5	3,9	8,7	10,5	6,5	1,2
Общий азот, %	6,35	3,75	2,15	1,55	5,82	3,60	2,20	1,80
Белки, %	39,5	23,5	13,4	9,7	36,4	22,5	13,8	11,2
Углеводы, %	49,5	52,5	44,8	43,0	50,5	53,5	47,5	45,5
Липиды, %	11,0	21,0	35,7	44,5	10,5	22,1	35,5	41,0
Зола, %	3,3	3,7	2,4	2,0	3,4	3,6	2,5	2,1

Таблица 4

Влияние режима азотного питания на продуктивность и химический состав зеленой водоросли *Oocystis* sp.

Показатели	Культура 1				Культура 2			
	Возраст в днях							
	14	21	28	35	14	21	28	35
Сухой вес, г/л	1,89	2,66	2,36	1,78	2,04	2,56	2,76	1,82
Продуктивность, г/м <sup>2</sup> в сутки	3,4	6,1	3,7	2,1	3,6	5,5	5,3	1,5
Эффективность фотосинтеза, %	4,5	8,3	6,7	4,2	4,4	7,9	8,9	3,3
Общий азот, %	6,55	3,94	2,54	1,74	5,88	3,47	2,52	1,70
Белки, %	40,9	24,6	15,9	10,9	36,7	21,7	15,8	10,6
Углеводы, %	35,0	43,0	43,0	40,0	33,5	46,0	46,5	41,3
Липиды, %	11,8	18,8	31,4	41,0	11,5	19,6	29,1	39,0
Зола, %	4,3	3,7	3,2	2,5	4,5	3,4	3,1	2,3

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гаевская Н. С. Выращивание массовых культур протококковых водорослей для рыбного хозяйства. Тр. Всес. гидробиол. о-ва, 1953, вып. 5, 72—108.
2. Горюнова С. В., Носонова М. В. Влияние люминесцентных ламп с различными люминофорами на рост и развитие одноклеточных водорослей *Scenedesmus quadricauda*. Микробиология, 1958, 27, 5, 581—587.
3. Ничипорович А. А., Семененко В. Е., Владимирова М. Г. Интенсификация фотосинтетической продуктивности культуры одноклеточных водорослей. Изв. АН СССР. Сер. биол., 1962, 2, 163—172.
4. Пахомова М. В., Серенков Г. П. Влияние света и темноты на химический состав зеленой водоросли *Scenedesmus quadricauda*. Вестн. МГУ. Сер. биол., 1962, 4, 44—47.
5. Смирнов Н. Н. Изменения химического состава протококковых водорослей в зависимости от химического режима среды. Тр. Моск. техн. ин-та рыбн. пром-сти и х-ва, 1959, 10, 62—74.
6. Чесноков В. А. Некоторые физиологические аспекты повышения продуктивности одноклеточных водорослей. Вестн. Ленингр. ун-та. Сер. биол., 1962, 2, 113—122.



7. Aach H. G. Über Wachstum und Zusammensetzung von *Chlorella pyrenoidosa* bei unterschiedlichen Lichtstärken und Nitratmengen. Arch. Mikrobiol., 1952, 17, 3, 213—246.
8. Champigny M. L. Etude de la croissance l'algues monocellulaires en cultures accélérées (Chlorelles et espèces voisines) IV — Variations de la composition en acides aminés de *Chlorella pyrenoidosa*, selon la nature de l'aliment azote. J. rech. Centre nat. rech. scient., 1957, 38, 72—76.
9. Collyer D. M., Fogg G. E. Studies on fat accumulation by algae. J. Exptl Bot., 1955, 6, 17, 256—275.
10. Davis E. A., Dedrick J., French C. S., Milner H. W., Myers J., Smith J. H. C., Spoehr H. A. Laboratory experiments on *Chlorella* culture at the Carnegie Inst. of Washington Department of Plant Biology. Algal Culture, Carnegie Inst. of Washington, Publ. 600, 1953, 105—153.
11. Iwamoto H., Suzuki A. Fat synthesis in unicellular algae. Part IV. Nocturnal effect of fat accumulation in *Chlorella*. Bull. Agric. Chem. Soc., Japan, 1958, 22, 6, 420—425.
12. Krauss R. W. Inorganic nutrition of algae. Algal Culture, Carnegie Inst. of Washington, Publ. 600, 1953, 85—102.
13. Middleton K. J. New Nessler reagent and its use in the direct nesslerisation of Kjeldahl digest. J. Appl. Chem., 1960, 10, 7, 281—286.
14. Roe J. H. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone method. J. Biol. Chem., 1955, 212, 1, 335—345.
15. Sorokin C., Krauss R. W. The effects of light intensity on the growth rates of green algae. Plant Physiol., 1958, 33, 2, 109—113.
16. Spoehr H. A., Milner H. W. The chemical composition of *Chlorella*. Effect of environmental conditions. Plant Physiol., 1949, 24, 1, 120—149.
17. Tamiya H., Hase E., Shibata K., Mitua A., Iwamura T., Nihei T., Sasa T. Kinetics of growth of *Chlorella* with special reference to its dependence on quantity of available light and temperature. Algal Culture, Carnegie Inst. of Washington, Publ. 600, 1953, 204—232.
18. Tipnis H. P., Pratt R. Protein and lipid content of *Chlorella vulgaris* in relation to light. Nature, 1960, 188, 4755, 1031—1032.
19. Thomas W. H., Krauss R. W. Nitrogen metabolism in *Scenedesmus* as affected by environmental changes. Plant Physiol., 1955, 20, 2, 113—122.
20. Wassink E. S., Kok B., Oorschot J. L. P. The efficiency of light-energy conversion in *Chlorella* cultures as compared with higher plants. Algal Culture, Carnegie Inst. of Washington, Publ. 600, 1953, 55—62.
21. Williams V. R., McMillan R. Lipids of *Ankistrodesmus braunii*. Science, 1961, 133, 3451, 459—460.

Институт зоологии и ботаники  
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию  
19. VII 1963

## LÄMMASTIKUGA TOITUMISE REŽIIMI MÕJU MÕNINGATE ROHEVETIKALIHKIDE KEEMILISELE KOOSTISELE

V. Jaaska

Resüme

Uuriti rohevetikate *Chlorella vulgaris* Beyer., *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb., *Oocystis* sp. ja *Chlorococcum botryoides* Rab. tüvede keemilise koostise muutumist pärast nitraatse lämmastiku lisamise lõpetamist kultuuridele.

Vetikaid kultiveeriti modifitseeritud Kraussi toitelahuses orgaanilisest klaasist nõudes temperatuuril 25—29° C. Kultuure valgustati pidevalt luminesentslampidega ja segati 0,2—0,5% süsihappegaasiga rikastatud õhuga. Artiklis esitatakse vetikate üldlämmastiku, süsivesikute ja lipiidide sisalduse määramise meetodika.

Kultuuride küllaldasel varustatusel nitraatse lämmastikuga sisaldasid uuritud rohevetikad 39—59% valku, 20—50% süsivesikuid ja 10—13% lipiide. Seejuures ilmsed igale rohevetikatüvele iseloomulikud erinevused süsivesikute ja valgusisalduses.

Lämmastiku defitsiidi puhul vähenes kõigis uuritud rohevetikatüvedes valgusisaldus 10—19%-ni ja, olenevalt vetikaliigist, akumuleerusid lipiidid või süsivesikud. Rohevetikad *Chlorella vulgaris*, *Oocystis* sp. ja *Chlorococcum botryoides* akumuleerisid lämmastiku nälguse korral 40—50% lipiide. Samades tingimustes akumuleeris rohevetikas *Scenedesmus quadricauda* kuni 75% süsivesikuid, kuna lipiidide sisaldus kasvas ainult 19%-ni.



Rohevetikate maksimaalsed saagised antud kultiveerimistingimustes olid 4,5–6,9 g/m<sup>2</sup> ööpäevas, fotosünteesi kasutegurid 5,8–10,5%. Iseloomulikud muutused rohevetikate keemilises koostises toimusid enne vetikate produktiivsuse järsku langust, mis algas sügava lämmastikudefitsiidi tingimustes.

Töö tulemused näitavad, et lämmastikuga toitumise režiimi sihikindel reguleerimine võimaldab suunavalt mõjustada rohevetikate ainevahetust ja kasvatada neid soovitud valgus-, süsivesikute ja lipiidide sisalduse suunas.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Saabus toimetusse  
19. VII 1963

## EFFECT OF NITROGEN NUTRITION CONDITIONS ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF SOME GREEN ALGAE

V. Jaaska

### Summary

The present paper deals with changes in the chemical composition of the green algae *Chlorella vulgaris* Beyer., *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb., *Oocystis* sp. and *Chlorococcum botryoides* Rab. after stopping the nitrogen supply to the cultures.

The algae were cultivated in a modified Krauss' nutrient solution under continuous illumination by daylight fluorescent lamps and continuous aeration with 0.2–0.5% CO<sub>2</sub> and air mixture at 25–29° C. The methods of the determination of algal total nitrogen, lipid and carbohydrate content have been described.

When grown under an adequate supply of nitrogen in the form of potassium nitrate, the green algae contained 39–59% of protein, 20–50% of carbohydrates and 10–13% of lipids. The experiments revealed differences in protein and carbohydrate content which are characteristic of each strain of the green algae.

Under nitrogen deficiency the protein content of all the investigated green algae decreased to 10–19%, and the accumulation of lipids or carbohydrates occurred, depending on the species of the algae. Under the conditions of nitrogen deficiency the green algae *Chlorella vulgaris*, *Oocystis* sp. and *Chlorococcum botryoides* accumulated up to 40–50% of lipids. In the same conditions the green alga *Scenedesmus quadricauda* accumulated up to 75% of carbohydrates, while the lipid content increased only up to 19%.

The maximum yields of the green algae under the cultivation conditions used were 4.5–6.9 g/m<sup>2</sup> per day and the maximum photosynthetic efficiencies were 5.8–10.5%. The yields dropped only in the later phase of nitrogen deficient growth when the characteristic changes in the chemical composition of the algae had already occurred.

The results of the present investigation indicate that by a purposeful regulation of the nitrogen nutrition conditions it is possible to affect the metabolism of the green algae and to cultivate them with a desirable protein, carbohydrate, and lipid content.

Academy of Sciences of the Estonian S.S.R.,  
Institute of Zoology and Botany

Received  
July 19th, 1963