

УДК 576.32/36:582.263:546.185:546.712:577.112

И.А. ИЛЮЧИК

старший преподаватель кафедры биохимии и биоинформатики¹

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

Б.Л. СТАНКЕВИЧ

студент¹

¹Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Статья поступила 5 октября 2021 г.

**ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ОРТОФОСФАТА НА
ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ
МИКРОВОДОРОСЛИ *CHLORELLA VULGARIS* ШТАММА С 111 ИВСЕ С-19
ПРИ НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ ХЛОРИДА МАРГАНЦА (II)
В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

Изучен характер изменений уровня биомассы, концентрации внутриклеточного белка, хлорофиллов а и б, каротиноидов при культивировании хлореллы в течение 21 дня на питательной среде, содержащей KH_2PO_4 в концентрации 1,784–2,230 г/л на фоне $MnCl_2$ в концентрации 0,025 или 0,050 мг/л. Установлено, что при росте на всех экспериментальных вариантах питательной среды культура хлореллы находилась в физиологически активном состоянии. При росте водоросли на варианте « $MnCl_2$ 0,050 мг/л + KH_2PO_4 1,784 г/л» урожай биомассы был, в принципе, сопоставим с базовой средой Тамия, а по накоплению внутриклеточного белка даже превосходил ее.

Ключевые слова: культура хлореллы, неорганический ортофосфат, хлорид марганца (II), биомасса, внутриклеточный белок, хлорофиллы, каротиноиды.

ILYUCHYK Irina A.

Senior Lecturer of the Department of Biochemistry and Bioinformatics¹

NIKANDROV Vitaliy N., Doctor of Biol. Sc. Habil., Professor
Professor of the Department of Biotechnology¹

STANKEVICH Boris L.

Student¹

¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

**EFFECT OF INORGANIC ORTHOPHOSPHATE ON THE PHYSIOLOGICAL
AND BIOCHEMICAL STATE OF CELLS OF MICROALGAE *CHLORELLA
VULGARIS* STRAIN C 111 IBCE C-19 AT A LOW MANGANESE (II) CHLORIDE
CONCENTRATION IN THE NUTRIENT MEDIUM**

The nature of changes in the level of biomass, concentration of intracellular protein, chlorophylls a and b, carotenoids was studied during cultivation of chlorella for 21 days on a nutrient medium containing KH_2PO_4 at a concentration of 1.784–2.230 g / L against a background of $MnCl_2$ at a concentration of 0.025 or 0.050 mg / L. It was found that during growth on all experimental variants of the nutrient medium, the chlorella culture was in a physiologically active state. With the growth of algae on the variant “ $MnCl_2$ 0.050 mg / L + KH_2PO_4 1.784 g / L”, the biomass yield was, in principle, comparable to the basic Tamiya medium, and even surpassed it in the accumulation of intracellular protein.

Keywords: *chlorella culture, inorganic orthophosphate, manganese (II) chloride, biomass, intracellular protein, chlorophylls, carotenoids.*

Введение. Назревшую необходимость решения проблемы обеспечения животных и человека полноценным белком, витаминами и микроэлементами мы поднимали и ранее в наших статьях [1, 2]. В мировом масштабе ежегодно недостает около 30 млн т кормового белка [3]. Прогнозируемый ООН рост численности населения к 2030 году до 8,3 млрд человек и к 2050 году до 9,7–10,0 млрд человек [4] приведет к усугублению ситуации с дефицитом белка. Ликвидировать его за счет увеличения посевных площадей или поголовья скота уже невозможно. Поэтому достаточно остро стоит проблема поиска альтернативных источников белка. К таковым можно отнести и одноклеточные водоросли [5], в том числе хлореллу (*Chlorella*).

Хлорелла широко распространена, не требовательна к условиям обитания, размножается с высокой интенсивностью, что дает возможность получить значительное количество биомассы в короткий срок. В сухой биомассе хлореллы, выращенной на минеральных средах, содержится 55% белка [5, 6]. По качеству продуцируемого белка, содержащего незаменимые аминокислоты, и витаминов она превосходит все известные кормовые и пищевые продукты [6]. Хлорелла способна использовать более 70% солнечного света, тогда как большинство высших растений ~ 3%. При этом 1 кг водоросли выделяет за сутки до 270 литров кислорода [7].

В зависимости от условий культивирования в клетках хлореллы меняется соотношение белка, углеводов, липидов и минеральных веществ [8]. Это создает условия для разработки подходов к направленному изменению ее метаболизма.

Фосфор – жизненно необходимый макроэлемент. В качестве его источника при культивировании водоросли используют фосфаты [9], поглощение которых зависит от состояния процессов фотосинтеза и дыхания. Кроме того, благодаря фосфатазам, *Chlorella* способна использовать и фосфор органических соединений [10].

При высокой концентрации фосфора в среде культивирования, увеличивается его поглощение клетками без угнетения роста

культуры [10]. Однако избыток фосфора приводит к ускоренному развитию микроводорослей, культуры их быстро стареют [11].

Одним из эссенциальных микроэлементов является марганец. В предыдущих статьях нами было продемонстрировано влияние $MnCl_2$ в широком диапазоне концентраций на динамику роста культуры хлореллы, концентрацию внутриклеточного белка, пигментов фотосинтеза и активность протеиназ [1, 12, 13].

Эффект марганца на различные физиологические и биохимические процессы растений определяется его соотношением с другими химическими элементами, в том числе и с фосфором. Установлено, что при повышении концентрации в питательной среде фосфора с 5 до 50 мкМ в растениях изменяются проявления токсичности марганца [14].

Цель настоящей работы – выявить влияние концентраций неорганического ортофосфата на накопления биомассы, белка и фотосинтетических пигментов в клетках *Ch. vulgaris* при росте на питательной среде с концентрацией $MnCl_2$ 0,025 или 0,050 мг/л.

Материалы и методы. Исследования выполнены на альгологически чистой культуре *Ch. vulgaris* биологического штамма С 111 ИВСЕ С-19 из коллекции РУП «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

Микроводоросль выращивали на питательной среде, используя как основу среду Тамия [15] с иной концентрацией соли марганца (в оригинале – 0,500 мг/л), не содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту. В контрольном варианте $MnCl_2$ и KH_2PO_4 не добавляли. В экспериментальные варианты питательной среды вносили 0,025 мг/л $MnCl_2$ + 1,784 г/л KH_2PO_4 ; 0,025 $MnCl_2$ + 2,007 KH_2PO_4 ; 0,025 $MnCl_2$ + 2,230 KH_2PO_4 ; 0,05 $MnCl_2$ + 1,784 KH_2PO_4 ; 0,05 $MnCl_2$ + 2,007 KH_2PO_4 ; 0,05 $MnCl_2$ + 2,230 KH_2PO_4 .

Хлореллу культивировали в прозрачных сосудах объемом 0,25 л при температуре 25 ± 1 °С, освещенности на поверхности сосуда 5000 лк, которую регистрировали с помощью люксметра Ю-116, продолжительности световых и темновых фаз – 12 ч/12 ч. Посевная доза составляла $3,26 \pm 0,05$ млн/мл кле-

ток. Концентрацию клеток микроводоросли определяли визуально с помощью камеры Горяева.

На 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21-е сутки культивирования отбирали аликвоты культуры, содержащие по $10,0 \pm 0,03$ млн клеток, отделяли их путем центрифугирования при 6000 об/мин в течение 10 мин, дважды отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой.

Каждые вторые сутки роста культуры в гомогенатах клеток определяли концентрацию общего белка как описано нами ранее [1]. Определение содержания хлорофиллов *a* и *b*, каротиноидов проводили по формулам Н.К. Lichtenthaler при экстрагировании пигментов в 100%-ном ацетоне [16]. Пигментный индекс Маргалефа находили как соотношение уровня общих каротиноидов к хлорофиллу *a* [17].

Все операции при гомогенизации и спектрофотометрировании выполняли в затемненном помещении. Исследования проведены девятикратно. Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность различий между вариантами определяли с учетом коэффициента Стьюдента (*t*) для принятого уровня значимости ($P \leq 0,05$).

Результаты и их обсуждение.

При отсутствии в питательной среде $MnCl_2$ и KH_2PO_4 («нулевой вариант» – контроль) культура хлореллы сохраняла жизнеспособность на протяжении 21 дня. Это позволяет считать, что инокулят содержал минимально достаточное количество фосфора и катионов марганца.

Через 5 дней в сравнении с началом культивирования отмечены прирост биомассы на 25% и убыль внутриклеточного белка на 17% (таблица, рисунок *a, б*). Через 9 дней прирост биомассы хлореллы составил 43%, а через 13 дней количество клеток водоросли снизилось на 23%. Однако уже через 17 дней уровень биомассы возрос в сравнении с 9-м днем и с началом культивирования на 40 и 54% соответственно. К концу культивирования в этих условиях, тем не менее, в сравнении с началом культивирования выявлено увеличение концентрации клеток и концентрации внутриклеточного белка на 49 и 28% соответственно.

Концентрация хлорофиллов *a* и *b* нарастала: особенно заметно увеличение уровня хлорофилла *a* через 17 дней на 71%, а хлорофилла *b* – через 7 дней на 64% (таблица, рисунок *в, г*). К окончанию культивирования содержание этих пигментов возрастало по сравнению с началом в 3,4 и 4,8 раза соответственно.

Колебания уровня каротиноидов на протяжении длительного времени не превысили 12%. Тем не менее, через 21 день их концентрация увеличилась на 98%.

При концентрации в питательной среде $MnCl_2$ 0,025 мг/л. Внесение ортофосфата в концентрации 1,784 г/л сопровождалось колебательным характером роста биомассы. Так, концентрации биомассы и внутриклеточного белка через 7 дней увеличились на 74 и 24% в сравнении с началом культивирования, а в сравнении с нулевым контролем – на 39% и более чем в 7 раз соответственно. Через 9 дней прирост биомассы с началом культивирования составил 49%, но в сравнении с контролем – лишь 17%. Дальнейшее культивирование сопровождалось, в целом, ростом уровня биомассы и концентрации внутриклеточного белка, и через 21 день они превышали исходный уровень в 2,4 и 1,8 раза соответственно. К окончанию эксперимента концентрация биомассы и внутриклеточного белка превосходили таковые «нулевого варианта» на 81,7 и 88,5% (таблица, рисунок *a, б*).

Колебательный характер четко проявился в динамике концентрации хлорофиллов. Через 7 дней от начала культивирования уровень хлорофиллов *a* и *b* в сравнении с 1-м днем нарастал в 4,5 и 7,8 раза соответственно (таблица, рисунок *в, г*).

В процессе дальнейшего развития культуры водоросли их уровень падал в 3,1 и 5,2 раза, и только к окончанию процесса он вновь вырастал в 4,6 и 7,7 раза в сравнении с началом культивирования.

Относительно концентрации каротиноидов наблюдались значительно меньшие колебания: лишь через 13 дней их уровень падал на 39,1% в сравнении с предыдущим сроком, достигая затем максимума к концу эксперимента, когда их концентрация по сравнению с началом культивирования удваивалась (таблица, рисунок *д*).

Таблица – Динамика биомассы, внутриклеточного белка и фотосинтетических пигментов в культуре *Ch. vulgaris* при добавлении в среду $MnCl_2$ на фоне различной концентрации ортофосфата

Сутки	Биомасса, млн кл./мл	Содержание белка, мкг/млн кл.	Концентрация пигментов, мг/млн кл.		
			хлорофилл <i>a</i>	хлорофилл <i>b</i>	каротиноиды
Концентрация $MnCl_2$, мг/л / KH_2PO_4, г/л					
контроль					
1	3,33 ± 0,07	29,06 ± 0,08	22,75 ± 0,45	20,65 ± 0,20	6,40 ± 0,20
3	3,52 ± 0,04	26,48 ± 0,04	29,70 ± 0,27	22,95 ± 0,13	7,15 ± 0,27
5	4,17 ± 0,02	24,21 ± 0,02	29,60 ± 0,36	28,75 ± 0,45	7,15 ± 0,19
7	4,66 ± 0,04	28,34 ± 0,03	33,15 ± 0,13	33,85 ± 0,21	7,80 ± 0,15
9	4,75 ± 0,08	29,71 ± 0,09	32,10 ± 0,44	32,55 ± 0,25	6,85 ± 0,09
11	4,52 ± 0,12	26,32 ± 0,10	29,70 ± 0,15	26,20 ± 0,13	8,10 ± 0,23
13	3,65 ± 0,05	29,04 ± 0,07	31,00 ± 0,25	31,30 ± 0,24	9,15 ± 0,14
15	4,34 ± 0,04	27,64 ± 0,02	33,65 ± 0,35	47,95 ± 0,30	5,55 ± 0,13
17	5,12 ± 0,06	30,11 ± 0,01	39,00 ± 0,23	54,20 ± 0,50	6,15 ± 0,23
19	4,37 ± 0,05	36,83 ± 0,07	29,20 ± 0,19	31,30 ± 0,29	6,70 ± 0,08
21	4,97 ± 0,07	37,21 ± 0,05	77,00 ± 0,65	98,30 ± 0,70	12,65 ± 0,14
0,025 / 1,784					
1	3,73 ± 0,04	38,12 ± 0,02*	20,25 ± 0,23	18,65 ± 0,13	5,80 ± 0,12
3	3,68 ± 0,02	38,42 ± 0,10*	22,45 ± 0,55*	20,20 ± 0,12	6,10 ± 0,26*
5	4,01 ± 0,02	39,71 ± 0,01*	41,55 ± 0,45*	71,95 ± 0,40*	8,35 ± 0,32*
7	6,48 ± 0,04*	46,84 ± 0,03*	91,35 ± 0,65*	144,85 ± 0,65*	4,25 ± 0,18*
9	5,56 ± 0,18*	52,28 ± 0,04*	42,30 ± 0,45*	42,15 ± 0,25*	5,80 ± 0,22*
11	4,15 ± 0,09	45,13 ± 0,01*	29,65 ± 0,35	27,75 ± 0,13	7,00 ± 0,30*
13	4,52 ± 0,23*	46,39 ± 0,06*	37,55 ± 0,26*	34,80 ± 0,25*	8,15 ± 0,15
15	6,61 ± 0,05*	53,72 ± 0,05*	35,75 ± 0,35	34,70 ± 0,32*	8,40 ± 0,13*
17	8,09 ± 0,06*	68,25 ± 0,02*	32,25 ± 0,31*	27,20 ± 0,20*	9,60 ± 0,19*
19	6,46 ± 0,10*	59,46 ± 0,01*	33,15 ± 0,24*	29,60 ± 0,17	9,50 ± 0,12*
21	9,03 ± 0,03*	70,14 ± 0,03*	92,80 ± 0,35*	145,00 ± 0,75*	5,95 ± 0,10*
0,025 / 2,007					
1	2,53 ± 0,02*	37,07 ± 0,01*	19,95 ± 0,55*	17,70 ± 0,14*	5,95 ± 0,17
3	3,25 ± 0,03	39,23 ± 0,04*	22,30 ± 0,13*	19,60 ± 0,14*	6,10 ± 0,30*
5	3,65 ± 0,03*	38,71 ± 0,07*	22,35 ± 0,24*	38,70 ± 0,35*	9,90 ± 0,27*
7	4,18 ± 0,02	50,17 ± 0,03*	32,15 ± 0,35	24,80 ± 0,24*	10,20 ± 0,21*
9	4,35 ± 0,13	50,92 ± 0,05*	37,90 ± 0,25*	31,00 ± 0,25	8,85 ± 0,21*
11	3,98 ± 0,02	46,67 ± 0,02*	41,85 ± 0,45*	37,00 ± 0,16*	10,40 ± 0,12*
13	3,08 ± 0,06*	39,08 ± 0,03*	40,60 ± 0,33*	37,65 ± 0,25*	9,90 ± 0,15
15	3,79 ± 0,02*	40,62 ± 0,10*	38,80 ± 0,26*	35,25 ± 0,31*	10,6 ± 0,18*
17	4,14 ± 0,08*	48,40 ± 0,04*	36,80 ± 0,26	26,25 ± 0,15*	12,80 ± 0,22*
19	7,58 ± 0,02*	61,27 ± 0,02*	26,50 ± 0,22	29,70 ± 0,18	6,30 ± 0,12
21	5,26 ± 0,04	58,39 ± 0,04*	80,40 ± 0,27	121,15 ± 0,45*	13,50 ± 0,14
0,025 / 2,230					
1	2,57 ± 0,04*	39,42 ± 0,02*	25,05 ± 0,65	17,70 ± 0,12*	8,00 ± 0,31*
3	2,98 ± 0,04*	41,24 ± 0,03*	26,4 ± 0,45	20,60 ± 0,13	8,25 ± 0,25*
5	3,51 ± 0,02*	45,13 ± 0,01*	18,25 ± 0,35*	31,60 ± 0,25	8,15 ± 0,35*
7	5,03 ± 0,04	51,38 ± 0,05*	35,30 ± 0,25	35,45 ± 0,20	8,50 ± 0,35
9	5,05 ± 0,04	52,05 ± 0,07*	28,55 ± 0,56	40,75 ± 0,31*	7,10 ± 0,12
11	5,05 ± 0,03	52,16 ± 0,04*	36,60 ± 0,34*	33,35 ± 0,17*	9,20 ± 0,18*
13	4,07 ± 0,09	45,87 ± 0,01*	41,25 ± 0,25*	42,00 ± 0,36*	8,80 ± 0,12
15	4,52 ± 0,06	47,60 ± 0,06*	33,15 ± 0,17	33,65 ± 0,23*	7,20 ± 0,21*
17	6,31 ± 0,03*	59,64 ± 0,02*	28,75 ± 0,35*	27,25 ± 0,21*	7,05 ± 0,15*
19	8,82 ± 0,08*	73,41 ± 0,05*	21,10 ± 0,13*	24,50 ± 0,21*	5,10 ± 0,06*
21	5,62 ± 0,02*	66,34 ± 0,10*	66,25 ± 0,35*	112,40 ± 0,26*	0,45 ± 0,18*

0,050 / 1,784					
1	3,35 ± 0,03	38,76 ± 0,02*	10,9 ± 0,35*	15,25 ± 0,16*	1,60 ± 0,08*
3	3,17 ± 0,04	38,20 ± 0,01*	12,4 ± 0,25*	15,90 ± 0,13*	2,40 ± 0,16*
5	3,59 ± 0,05*	39,46 ± 0,05*	27,00 ± 0,55	46,80 ± 0,40*	6,00 ± 0,12*
7	4,21 ± 0,02	40,54 ± 0,10*	31,45 ± 0,24	25,70 ± 0,21*	10,00 ± 0,28*
9	4,73 ± 0,04	41,15 ± 0,07*	34,10 ± 0,23	35,65 ± 0,30	9,50 ± 0,07*
11	5,31 ± 0,16*	46,33 ± 0,03*	46,40 ± 0,57*	53,50 ± 0,35*	8,10 ± 0,22
13	5,22 ± 0,21*	48,42 ± 0,10*	34,00 ± 0,55	34,10 ± 0,27	7,50 ± 0,25*
15	7,82 ± 0,07*	57,61 ± 0,07*	23,75 ± 0,25*	38,90 ± 0,34*	2,30 ± 0,15*
17	9,62 ± 0,06*	60,38 ± 0,04*	19,60 ± 0,15*	16,85 ± 0,18*	6,25 ± 0,26
19	16,30 ± 0,06*	89,93 ± 0,02*	20,55 ± 0,12*	23,70 ± 0,34*	2,60 ± 0,08*
21	9,05 ± 0,03*	71,54 ± 0,06*	58,35 ± 0,43*	51,90 ± 0,25*	19,55 ± 0,22*
0,050 / 2,007					
1	3,72 ± 0,05	38,10 ± 0,02*	52,45 ± 0,45*	73,00 ± 0,35*	6,30 ± 0,25
3	2,98 ± 0,04*	40,81 ± 0,01*	46,15 ± 0,23*	84,90 ± 0,30*	10,50 ± 0,35*
5	3,90 ± 0,06	39,18 ± 0,07*	16,50 ± 0,43*	28,60 ± 0,12	7,35 ± 0,22
7	5,02 ± 0,08	51,25 ± 0,05*	33,55 ± 0,55	37,95 ± 0,27	8,25 ± 0,13
9	5,05 ± 0,03	53,67 ± 0,02*	37,55 ± 0,35*	34,90 ± 0,25	8,85 ± 0,02*
11	5,02 ± 0,04	52,98 ± 0,03*	37,75 ± 0,65*	32,85 ± 0,35*	9,20 ± 0,17*
13	4,86 ± 0,07*	50,30 ± 0,01*	49,55 ± 0,41*	47,90 ± 0,16*	11,35 ± 0,35*
15	5,02 ± 0,04*	51,43 ± 0,04*	50,25 ± 0,30*	48,50 ± 0,20	11,35 ± 0,37*
17	5,57 ± 0,11	51,68 ± 0,10*	59,65 ± 0,25*	47,15 ± 0,24*	16,45 ± 0,25*
19	8,55 ± 0,07*	64,70 ± 0,06*	42,35 ± 0,24*	37,15 ± 0,27*	10,30 ± 0,31*
21	8,02 ± 0,06*	63,94 ± 0,04*	63,25 ± 0,28*	60,25 ± 0,25*	17,35 ± 0,15*
0,050 / 2,230					
1	3,58 ± 0,08	41,27 ± 0,05*	9,55 ± 0,55*	14,45 ± 0,16*	1,95 ± 0,10*
3	2,96 ± 0,09*	42,38 ± 0,07*	10,85 ± 0,65*	14,55 ± 0,12*	2,60 ± 0,12*
5	3,22 ± 0,04*	46,15 ± 0,02*	32,65 ± 0,23	56,60 ± 0,13*	2,05 ± 0,10*
7	5,08 ± 0,04	52,20 ± 0,01*	31,70 ± 0,35	31,70 ± 0,30	7,90 ± 0,21
9	4,84 ± 0,05	53,46 ± 0,03*	30,90 ± 0,25	48,75 ± 0,25*	8,10 ± 0,04*
11	4,16 ± 0,09	48,39 ± 0,10*	50,05 ± 0,62*	56,20 ± 0,32*	8,00 ± 0,21
13	3,08 ± 0,06*	41,87 ± 0,06*	49,80 ± 0,45*	58,91 ± 0,30*	8,80 ± 0,20
15	4,42 ± 0,06	49,51 ± 0,03*	65,50 ± 0,25*	56,50 ± 0,33*	9,60 ± 0,24*
17	5,25 ± 0,06	50,18 ± 0,06*	72,00 ± 0,35*	95,70 ± 0,40*	9,20 ± 0,33*
19	9,43 ± 0,05*	74,64 ± 0,02*	22,50 ± 0,32*	20,55 ± 0,11*	6,25 ± 0,11
21	7,61 ± 0,03*	69,30 ± 0,04*	63,50 ± 0,44*	77,05 ± 0,35*	11,00 ± 0,08*

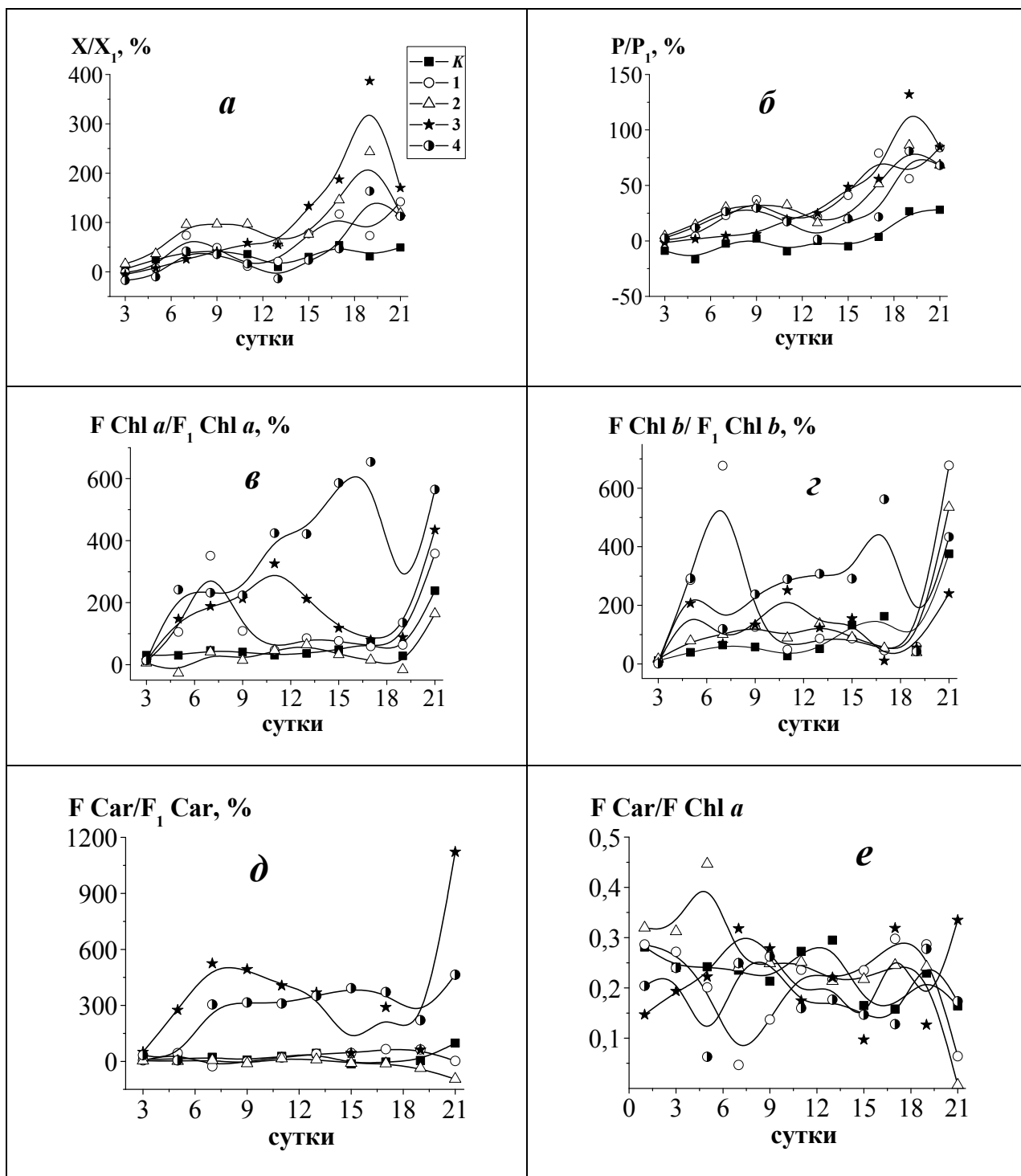
Примечание – *Изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$

Увеличение концентрации в питательной среде ортофосфата до 2,007 г/л вызвало снижение роста биомассы хлореллы и концентрации внутриклеточного белка в сравнении с предыдущим вариантом. Динамика этих показателей также носила колебательный характер: их рост через 9 дней от начала культивирования на 71,9 и 37,4% сменялся через 13 дней падением (таблица). Максимальное увеличение урожая биомассы и внутриклеточного белка было выявлено через 19 дней: в 3,0 и 1,7 раза в сравнении с началом культивирования и в 1,7 и 1,7 раза в этот же период с контрольным вариантом.

В динамике концентрации хлорофиллов также отмечен колебательный характер, но

менее резкий, чем при концентрации ортофосфата 1,784 г/л (таблица). По окончании эксперимента уровень хлорофиллов *a* и *b* в сравнении с 1-м днем возрос в 4,0 и 6,9 раза соответственно. При этом содержание хлорофилла *a* мало отличалось от такового в контроле.

Что касается динамики содержания каротиноидов, то после начального роста на 44% в сравнении с началом культивирования, через 7 дней его уровень падал почти вдвое, а максимального значения этот показатель достигал через 17–19 дней, увеличиваясь в сравнении с началом культивирования в 1,7 раза (таблица).



Рисунк – Динамика (% по отношению к 1 суткам, принятым за 100%) уровня биомассы (а), внутриклеточного белка (б), хлорофилла а (в), хлорофилла b (г), каротиноидов (д) и изменение величины пигментного индекса Маргалефа (е) в клетках культуры *Ch. vulgaris* при росте на питательной среде на фоне $MnCl_2$ и различной концентрации ортофосфата; контроль – К; концентрация $MnCl_2$ (мг/л)/ KH_2PO_4 (г/л): 0,025/1,784 (1); 0,025/2,230 (2); 0,050/1,784 (3); 0,050/2,230 (4)

Дальнейшее увеличение концентрации в питательной среде ортофосфата до 2,230 г/л вызвало колебания уровня биомассы водо-

росли и заметно меньшие колебания концентрации внутриклеточного белка в динамике культивирования (таблица, рисунок а, б). Су-

дя по полученным результатам, через 11 дней уровень биомассы и концентрация белка возрастали на 96,5 и 32,3% соответственно. Но если урожай биомассы через 13 дней снизился на 19%, то сдвиги концентрации белка, не превысили 12%. Максимальных величин эти показатели достигали, также как и в предыдущем варианте, через 19 дней от начала культивирования: в 3,4 и 1,9 раза, а в сравнении с контрольным вариантом в тот же период развития культуры – в 2,0 и 2,0 раза соответственно.

Динамика концентрации хлорофиллов носила выраженный колебательный характер (в большей мере хлорофилла *a*). Максимальный уровень хлорофиллов *a* и *b* отмечен через 21 день; превышение в сравнении с началом культивирования в 2,6 и 6,4 раза соответственно (таблица, рисунок *в, з*).

Колебания в динамике уровня каротиноидов на протяжении 17 дней развития культуры здесь были менее заметны и не превысили 15%. Лишь через 19 дней этот показатель снижался в два раза в сравнении с предыдущим периодом (таблица, рисунок *д*).

При концентрации в питательной среде $MnCl_2$ 0,050 мг/л. На фоне данной концентрации соли марганца внесение ортофосфата в питательную среду в концентрации 1,784 г/л вызвало нарастающее в процессе культивирования увеличение урожая биомассы и концентрации внутриклеточного белка с максимумом через 19 дней. В сравнении с началом развития культуры оно составило 4,9 и 2,3 раза и превосходило максимальные значения контроля в 3,2 и 2,4 раза соответственно. Динамика показателей не была линейной, но она была лишена резких колебаний (таблица, рисунок *а, б*).

Что касается сдвигов концентрации хлорофиллов *a* и *b*, то они, как и в рассмотренных выше вариантах, носили колебательный характер (таблица, рисунок *в, з*). Так, в период 1–11 день уровень этих пигментов возрос в 4,3 и 3,5 раза соответственно. Причем сдвиги хлорофилла *b* были сложнее: за ростом в 1–5 день в 3,1 раза через 7 дней следовало падение его уровня по сравнению с этим ростом на 45%. Концентрация обоих пигментов снижалась в период 5–17 день в 2,4 и 3,2 раза. Затем величина этого показателя в конце культивирования для хлорофиллов *a* и *b* достигала увеличения в 5,4 и 3,4 раза соответ-

ственно по сравнению с началом культивирования. Однако в этот конечный период урожай биомассы и концентрация внутриклеточного белка были уже меньше максимального уровня, отмеченного нами выше для 19 дней.

Содержание в клетках водоросли каротиноидов в период 1–7 дней увеличивалось в 6,3 раза. При последующем культивировании их уровень падал к 15 дням в 4,3 раза, достигая максимума к окончанию культивирования – в 12,2 раза в сравнении с началом эксперимента, но не через 19 дней, когда выявлен максимум урожая биомассы и концентрации внутриклеточного белка (таблица, рисунок *д*).

С увеличением в питательной среде концентрации ортофосфата до 2,007 г/л максимального уровня урожай биомассы и концентрация внутриклеточного белка достигали также через 19 дней (таблица). Увеличение в сравнении с началом культивирования составило 198 и 69,8% соответственно (таблица). Динамика этих показателей не носила колебательный характер. Однако в сравнении с предыдущим вариантом максимальный выход биомассы и белка был ниже в 1,9 и 1,4 раза.

Концентрация обоих хлорофиллов претерпела сдвиги колебательного плана. Так, в период 1–5 день уровень хлорофиллов *a* и *b* падал в 3,2 и 3,0 раза соответственно. В последующем содержание хлорофиллов нарастало, однако, если к концу культивирования уровень хлорофилла *a* на 20,6% превышал исходный уровень, то для хлорофилла *b* он был ниже исходного на 17,5% (таблица).

Относительно содержания каротиноидов можно отметить его колебания в первые 5 дней: резкое возрастание на 66,7% через 3 дня и падение уровня пигментов через 5 дней на 30%. При последующем развитии культуры их уровень постепенно возрастал, достигая максимума через 21 день, когда их содержание в 2,8 раза превышало исходные значения (таблица).

Добавление в питательную среду неорганического ортофосфата в концентрации 2,230 г/л также не вело к сильным проявлениям колебаний в динамике роста культуры урожая биомассы и концентрации внутриклеточного белка. Лишь через 13 дней было обнаружено снижение уровня этих показателей

на 26,0 и 33,2% соответственно. Как и в ранее рассмотренных вариантах, максимальных величин эти показатели достигали через 19 дней. При этом урожай биомассы и концентрация внутриклеточного белка возрастали в сравнении с началом культивирования в 2,6 и 1,8 раза. Но в сравнении с вариантом « MnCl_2 0,050 мг/л + KH_2PO_4 1,784 г/л» максимально достигаемый уровень этих показателей был на 27,1 и 17% ниже.

Динамика содержания хлорофиллов *a* и *b* на протяжении 17 дней роста культуры, пожалуй, не имела выраженного колебательного характера. Исключение составило снижение уровня хлорофилла *b* через 7 дней на 44% в сравнении с предыдущим сроком. Через 17 дней уровень хлорофиллов *a* и *b* достигал максимума, увеличиваясь в сравнении с началом эксперимента в 7,5 и 6,6 раза соответственно. А вот на завершающей стадии – 17–21 день были выявлены падение концентрации пигментов в 3,2–4,6 раза по сравнению с предыдущим периодом и нарастание ее к 21 дню до 81–88% от указанного максимума (таблица, рисунок *в, г*).

Содержание в клетках каротиноидов в период 1–17 день нарастало, особенно резко через 7 дней: в 3,9 раза в сравнении с предыдущим сроком. В дальнейшем колебаний этого показателя не отмечено, и через 15–17 дней он возрастал в 4,7 раза в сравнении с исходным уровнем. После этого концентрация пигментов снижалась на 35% и затем увеличивалась в 5,6 раза, достигая максимума к концу культивирования (таблица, рисунок *д*).

Величина индекса Маргалефа ($\text{Car}/\text{Chl } a$) соответствовала 0,01–0,45 (рисунок *е*), что свидетельствует о физиологически активном состоянии культуры хлореллы на протяжении всего культивирования. Известно, что величина в молодых культурах обычно находится в пределах от 0,28–0,40 [12].

Изложенные выше результаты были сопоставлены с таковыми, полученными нами ранее на оригинальном составе среде Тамия – « MnCl_2 0,500 мг/л + KH_2PO_4 1,250 г/л» [1]. Следует, однако, учесть, что в описанном в настоящей статье эксперименте в большинстве вариантов максимальный урожай биомассы хлореллы и концентрации внутриклеточного белка достигался через 19 дней.

На среде Тамия через 16 и 22 дней от начала культивирования микроводоросли урожай биомассы в сравнении с 1-м днем возрастал в 2,41 и 4,24 раза соответственно, а концентрация внутриклеточного белка – только через 16 дней в 2,01 раза. Величина последнего показателя через 22 дня была на 29% меньше, чем в начале роста культуры [1].

Среди изученных в настоящем эксперименте вариантов питательной среды оптимальным, на наш взгляд, является вариант « MnCl_2 0,050 мг/л + KH_2PO_4 1,784 г/л». Урожай биомассы при росте хлореллы на этой питательной среде через 19 и 21 день возрастал в сравнении с началом культивирования в 4,87 и 2,70 раза соответственно. Тогда как концентрация внутриклеточного белка в эти же сроки была выше по сравнению с 1-м днем в 2,32 и 1,85 раза.

Кроме того, следует учесть, что два анализируемых эксперимента были разделены во времени, при культивировании на среде Тамия использовали, по-видимому, более активный инокулят. Концентрация клеток хлореллы там уже в начале развития культуры была в 2,17 выше, чем в варианте « MnCl_2 0,050 мг/л + KH_2PO_4 1,784 г/л». Что же до уровня внутриклеточного белка, то принципиальных различий в сопоставляемых вариантах не было.

Далее. Величина соотношения уровня хлорофиллов *a* и *b* при развитии культуры хлореллы в рассматриваемом экспериментальном варианте питательной среды находится в пределах 0,5–1,4, что свидетельствует о невысокой активности фотосинтеза в клетках культуры, причины которой требуют дальнейшего отдельного выяснения.

И, несмотря на эти ограничения, испытанный нами вариант « MnCl_2 0,050 мг/л + KH_2PO_4 1,784 г/л» в сравнении с базовой средой был, в принципе, сопоставим с ней, а по концентрации внутриклеточного белка даже превосходил.

Нам не удалось обнаружить в литературе сведения о влиянии катионов марганца на обмен фосфатов. Проведенные ранее исследования роста культуры хлореллы на среде Тамия с увеличением концентрации ортофосфата (H_2PO_4^-) от 0,892 (среда Тамия) до 1,784 г/л в течение 21 дня показали, что это существенно не отражалось на урожае био-

массы. Однако, если на среде Тамия максимум концентрации внутриклеточного белка выявлен через 11 дней от начала развития культуры, то при увеличении концентрации неорганического ортофосфата максимальный уровень этого показателя наблюдали через 19–21 день. Причем, он превосходил максимальный уровень белка на среде Тамия на 15–29%, а в заключительный период культивирования – на 59–94% [18].

Заключение. Полученные результаты демонстрируют еще одну возможность направленного изменения урожая биомассы и концентрации внутриклеточного белка, варьируя содержание в питательной среде неорганического ортофосфата и катионов Mn^{2+} . Разумеется, в дальнейшем будут предприняты шаги в этом направлении.

Однако не менее, если не более, важным является раскрытие роли катионов этого металла в метаболизме фосфатов.

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 // Весн. Палес. дярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. – 2018. – № 1. – С. 53–64.
2. Ильючик, И. А. Физиолого-биохимическое состояние клеток культуры *Chlorella vulgaris* штамма ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с карбонатом аммония / И. А. Ильючик, Е. М. Кандыба, В. Н. Никандров // Весн. Палес. дярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук. – 2019. – № 2. – С. 40–50.
3. Загоровская, В. Новый белок. Готов ли российский рынок к альтернативным кормовым белкам? / В. Загоровская // Агротехника и технологии. – 2020. – № 1. – С. 50–54.
4. Ковалев, М. М. Прогнозирование развития белорусского агропромышленного комплекса до 2030 г. На фоне глобальных агротрендов / М. М. Ковалев, Е. А. Червякова // Журнал Белорус. гос. ун-та. Экономика. – 2017. – № 2. – С. 120–139.
5. Suman, G. Single cell protein production: A review / G. Suman [et al.] // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2015. – Vol. 4, № 9. – P. 251–262.
6. Ursu, A.-V. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris* / A.-V. Ursu [et al.] // Bioresour Technology. – 2014. – Vol. 157. – P. 134–139.
7. Melis, A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency / A. Melis // Plant Sci. – 2009. – Vol. 177, iss. 4. – P. 272–280.
8. Panahi, Y. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition / Y. Panahi [et al.] // Adv. Pharm. Bull. – 2019. – Vol. 9, iss. 2. – P. 182–194.
9. Guerra-Renteria, A. S. Metabolic Pathway Analysis of Nitrogen and Phosphorus Uptake by the Consortium between *C. vulgaris* and *P. aeruginosa* / A. S. Guerra-Renteria [et al.] // Int. J. of Molecular Sci. – 2019. – Vol. 20, iss. 8. – P. 1–9.
10. Лукьянов, В. А. Прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе / В. А. Лукьянов, А. И. Стифеев. – Курск : Изд-во Кур. гос. с.-х. акад., 2014. – 181 с.
11. Упитис, В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В.В. Упитис – М.: Рига, Зинатне, 1983. – 240 с.
12. Ильючик, И. А. Динамика фотосинтетических пигментов в культуре водоросли *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 при росте на питательной среде с добавлением хлорида марганца / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Весці Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2020. – Т. 65, № 3. – С. 299–309.
13. Ильючик, И. А. О протеолитической активности субклеточных фракций клеток *Chlorella vulgaris* штамма С 111 ИВСЕ С-19 / И.А. Ильючик, В.Н. Никандров // Доклады Нац. акад. наук Беларуси. – 2020. – Т. 64, № 6. – С. 694–701.
14. Pax C. Blamey, F. Manganese distribution and speciation help to explain the effects of silicate and phosphate on manganese toxicity in four crop species / F. Pax C. Blamey [et al.] // New Phytologist. – 2018. – Vol. 217. – P. 1146–1160.
15. Каталог генетического фонда хозяйственно полезных видов водорослей: научное издание / Национальная академия наук Беларуси, Институт биофизики и клеточ-

- ной инженерии; сост. С.С. Мельников [и др.]. – Минск: Беларуская навука. – 2011. – 101 с
16. Гавриленко, В. Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В. Ф. Гавриленко, Т. В. Жигалова ; под ред. И. П. Ермакова. – М. : Изд. центр «Академия», 2003. – 256 с.
17. Елизарова, В. А. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне водоемов разного типа : автореф. дис. канд. биол. наук : 03.00.18 / В. А. Елизарова ; Ин-т биологии внутренних вод АН СССР. – М., 1975. – 24 с.
18. Ильючик, И. А. Влияние неорганического ортофосфата на динамику накопления биомассы и внутриклеточного белка в культуре хлореллы (*Chlorella vulgaris*) / И. А. Ильючик, А. И. Лакишик, В. Н. Никандров // Биотехнология: достижения и перспективы развития: сб. матер. IV Междунар. научно-практ. конф., Пинск, 20–22 ноября 2019 г. – Пинск : ПолесГУ, 2019. – С. 52–57.
- References**
1. Il'yuchik I.A., Nikandrov V.N. Rost kultury chlorellyi (*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 dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2018, no. 1, pp. 53–64. (In Russian)
2. Il'yuchik I.A., Kandyba E.M., Nikandrov V.N. Fiziologo-biohimicheskoe sostoyanie kletok kul'tury *Chlorella vulgaris* shtamma IBCE C-19 pri roste na pitatel'noj srede s karbonatom ammoniya [Physiology and biochemical state of *Chlorella vulgaris* IBCE C-19 cell during the culture growth on medium with ammonium carbonate]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in Natural Sciences], 2019, no. 2, pp. 40–50. (In Russian)
3. Zagorovskaya V. Novyj belok. Gotov li rossiyskiy rynek k al'ternativnym kormovym belkam [New protein. Is the Russian market ready for alternative feed proteins?]. *Agrotekhnika i tekhnologii* [Agrotechnics and Technology], 2020, no. 1, pp. 50–54. (In Russian)
4. Kovalev M.M., Chervyakova E.A. Prognozirovanie razvitiya belorusskogo agropromyshlennogo kompleksa do 2030 g. Na fone global'nyh agrotrendov [Forecasting the development of the Belarusian agro-industrial complex until 2030 Against the background of global agricultural trends]. *Zhurnal Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Ekonomika* [Journal of the Belarusian State University. Economy], 2017, no. 2, pp. 120–139. (In Russian)
5. Suman G., Nupur M., Anuradha S., Pradeep B. Single cell protein production: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2015, vol. 4, no. 9, pp. 251–262.
6. Ursu A.-V. et al. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technology*, 2014, vol. 157, pp. 134–139.
7. Melis, A. et al. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 2009, vol. 177, iss. 4, pp. 272–280.
8. Panahi Y., Khosroushahi A.Y., Sahebkar A., Heidari H.R. Impact of cultivation condition and media content on *Chlorella vulgaris* composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2019, vol. 9, iss. 2, pp. 182–194.
9. Guerra-Renteria A.S. et al. Metabolic Pathway Analysis of Nitrogen and Phosphorus Uptake by the Consortium between *C. vulgaris* and *P. aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, Vol. 20, iss. 8, pp. 1–9.
10. Luk'yanov V.A., Stifeev A.I. Prikladnye aspekty primeneniya mikrovodoroslej v agrocenoze [Applied aspects of the use of microalgae in agrocenosis]. Kursk: Izdatel'stvo Kurskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii, 2014. 181 p. (In Russian)
11. Upitis V.V. Makro- i mikroelementy v optimizatsii mineral'nogo pitaniia mikrovodoroslei [Macro and microelements in the optimization of mineral nutrition of microalgae]. Riga, Zinatne Publ., 1983. 240 p. (In Russian)
12. Il'yuchik I.A., Nikandrov V.N. Dinamika fotosinteticheskikh pigmentov v kul'ture

- vodorosli *Chlorella vulgaris* shtamma C 111 IBCE C-19 pri roste na pitatel'noj srede s dobavleniem hlorida marganca [Dynamics of a photosynthetic pigments level of the *Chlorella vulgaris* strain C 111 IBCE C-19 during the growth at the nutrient medium with manganese chloride addition]. *Vesci Nacional'noy akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnyh nauk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series]. – 2020. – T. 65, № 3. – S. 299–309. (In Russian).
13. Il'uchik I.A., Nikandrov V.N O proteoliticheskoj aktivnosti subkletchnykh frakcij kletok *Chlorella vulgaris* shtamma S 111 IBCE C-19 [On proteolytic activity of subcellular fractions of *Chlorella vulgaris* strain C 111 IBCE C-19 cell]. *Doklady Nacional'noy akademii nauk Belarusi* [Reports of the National Academy of Sciences of Belarus] – 2020. – T. 64, № 6. – S. 694–701. (In Russian).
14. Pax C. Blamey F. [et al.] Manganese distribution and speciation help to explain the effects of silicate and phosphate on manganese toxicity in four crop species. *New Phytologist*, 2018, vol. 217, pp. 1146–1160.
15. 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).
16. 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).
17. 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).
18. Il'uchik I.A., Lakishik A.I., Nikandrov V.N. Vliyanie neorganicheskogo ortofosfata na dinamiku nakopleniya biomassy i vnutrikletchnogo belka v kulture chlorelly (*Chlorella vulgaris*) [Influence of inorganic orthophosphate on the dynamics of biomass and intracellular protein accumulation in the culture of chlorella (*Chlorella vulgaris*)] *Biotehnologiya: dostizheniya i perspektivy razvitiya: sbornik materialov IV mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, Pinsk, Respublika Belarus', 20–22 noyabrya 2019 g., Polesskij gosudarstvennyj universitet* [Biotechnology: Achievements and Development Prospects: Collection of Materials of the IV International Scientific and Practical Conference, Pinsk, Republic of Belarus, November 20-22, 2019, Polesky State University.] 2019, pp. 52–57. (In Russian).

Received 5 October 2021