

К. А. МИКАЕЛЯН, М. Н. БАРСЕГЯН

ВЛИЯНИЕ АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ НА РОСТ И БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ХЛОРЕЛЛЫ

Из одноклеточных зеленых водорослей хлорелла и сценедесмус могут расти в питательных растворах с разными количествами азота [1]. Синтез белка водорослей обусловлен в первую очередь уровнем азота в питательной среде. При достаточном азотном питании биосинтез направлен в сторону накопления белковых веществ, которые у хлореллы составляют 50—60% сухой биомассы. При недостаточном азотном питании или при азотном голодании биосинтез направляется в сторону накопления липидов или углеводов в клетках водорослей, уменьшается содержание минеральных элементов в биомассе. При азотном голодании также сильно снижается количество азота и белка [2—8]. В связи с этим представляет большой интерес изучение изменения аминокислотного состава хлореллы, выращенной в питательной среде без азота. Нас интересовал также вопрос: способна ли хлорелла восстанавливать относительно нормальный синтез аминокислот, если ее перенести снова в полный питательный раствор.

Методика

Объектом исследования служила *Chlorella pyrenoidosa*-82. Водоросли выращивали в стеклянных сосудах в условиях интенсивной культуры [9]. Для выращивания хлореллы использовали питательную среду Тамия. Опыт проводился по следующей схеме:

1. Выращивание хлореллы производилось в питательном растворе Тамия в течение 8 дней. Пробы для анализа брали на 4-й, 8-й день культивирования. Первоначальная густота суспензии—1 млн/мл.

2. На 8-й день часть суспензии центрифугировали, промывали дистиллированной водой, переносили: а) в полную питательную среду Тамия, б) в питательную среду Тамия без азота. Первоначальная густота суспензии—0,4 г/л. Выращивали хлореллу 3 дня.

3. Затем водоросли вновь переносили в полный питательный раствор Тамия и выращивали в течение 8 дней. Исходная густота суспензии при этом составляла 1 млн/мл. Исходный рН растворов—5,2.

Биохимические анализы проводили по методике, описанной в предыдущей статье [10].

Полученные результаты и их обсуждение

Ниже приводим данные по приросту биомассы хлореллы в разные дни культивирования и содержание в ней питательных элементов (таблица 1).

Таблица 1

Как видно из табл. 1, нарастание сухого веса хлореллы идет соответственно с возрастом культуры. В наших опытах на 8-й день культивирования по сравнению с 4-суточной культурой сухая биомасса хлореллы втрое увеличивается. С возрастом культуры в биомассе хлореллы несколько увеличивается процент фосфора и почти не подвергается изменению.

Урожай, содержание некоторых питательных элементов и золы в биомассе хлореллы

Дни выращивания	Сухой вес, г/л	В %		
		P ₂ O ₅	K ₂ O	зола
4-й	1.4	2.6	1.2	5.5
8-й	4.5	3.2	1.3	6.1

Таблица 2

Содержание общего и белкового азота в сухой биомассе хлореллы

Дни выращивания	Азот в %			Белок (белк. азот в 6.25)	Белковый азот в % от общего
	общий	белковый	небелковый		
4-й	8.8	7.5	1.3	47.0	85
8-й	7.3	6.2	1.1	38.8	85

Как видно из табл. 2, с возрастом культуры несколько уменьшается количество азота и белка в биомассе хлореллы. Однако в конце опыта отношение белкового азота к общему не меняется. Уменьшение содержания азота в конце опыта, очевидно, связано прежде всего с дефицитом азота в среде. Однако немаловажную роль, вероятно, играют и другие факторы внешней среды. Биомасса хлореллы, полученной на 8-й день культивирования, довольно богата аминокислотами. В ней отдельные аминокислоты содержатся в следующих процентах: лизин—2,9, гистидин—1,6, аргинин—2,7, аспарагиновая кислота—2,6, серин+глицин—5,3, глютаминовая кислота—3,2, треонин—2,6, аланин—4,3, тирозин—1,6, валин+метионин—1,7, фенилаланин—1,5, лейцин+изолейцин—3,7.

Таблица 3

Урожай и содержание фосфора, калия и золы в биомассе хлореллы

Питательные растворы	Сухой вес, г/л	В %		
		P ₂ O ₅	K ₂ O	зола
Среда без азота	1.0	1.8	0.7	3.2
Контроль	1.4	2.6	1.2	5.8

Сумма этих аминокислот составляет 33,8% сухого веса хлореллы. Обычно белок хлореллы по своему качеству сравнивается с белком молока. [11].

В табл. 3 приводятся сравнительные данные по накоплению сухого веса и содержания фосфора, калия, золы в биомассе хлореллы после выращивания ее в среде без азота и с нормальным содержанием азота.

После перенесения хлореллы в питательный раствор без азота наблюдается увеличение ее биомассы. Однако количество фосфора, калия и золы снижается, что объясняется дефицитом азота в среде. Предпола-

гается, что для синтеза липидов и углеводов требуется меньше зольных элементов, чем для синтеза белковых веществ [8].

Как отмечено рядом авторов, при азотном голодании продолжается нарастание сухого веса за счет синтеза других органических веществ, в связи с чем процентное содержание фракций азота на сухой вес снижается. Таким образом, содержание общего азота от 8—10% может снизиться до 2—3% сухого веса [5, 13, 14].

В наших опытах при азотном голодании в 2—3 раза снижается относительное содержание и общее количество азота и белка в биомассе хлореллы. В варианте без азота уменьшается отношение белкового азота к общему по сравнению с контролем (табл. 4), однако не всегда при азотном голодании снижается отношение белкового азота к общему [12].

Таблица 4
Содержание общего и белкового азота в сухой биомассе хлореллы

Питательные растворы	Азот в %			Белок (белковый азот < 6,6)	Белковый азот в % от общего
	общий	белковый	небелковый		
Среды без азота	3.2	2.5	0.7	15.0	80
Контроль	8.6	7.3	1.3	45.6	85

При азотном голодании в биомассе хлореллы снижается количество всех аминокислот по сравнению не только с исходной культурой, но и с контролем. Из определенных нами аминокислот больше всего уменьшается количество аргинина (4,5 раза). При аммиачном питании водорослей увеличение азота и белка связано с повышением количества аргинина в биомассе [7, 15].

Таблица 5
Содержание аминокислот в хлорелле при выращивании на среде без азота в %

Аминокислоты	Контроль	Среды без азота
Лизин	2.9	1.2
Гистидин	1.6	0.7
Аргинин	2.7	0.6
Аспарагиновая к-та	3.2	0.9
Серин+глицин	5.3	1.4
Глютаминовая к-та	3.6	1.0
Треонин	3.1	0.8
Аланин	4.3	1.3
Тирозин	1.7	0.8
Валин+метионин	1.5	0.6
Фенилаланин	1.5	0.6
Лейцин+изолейцин	3.8	1.2
Сумма аминокислот	35.2	11.1

После восьмидневного выращивания в нормальной питательной среде хлорелла почти восстанавливает прирост биомассы и содержание в ней фосфора, калия и золы.

Как видно из данных табл. 7, после азотного голодания хлорелла, выращенная в нормальном питательном растворе с азотом, начинает интенсивно накапливать белковый и небелковый азот в своих клетках, однако при этом, по сравнению с контрольным вариантом, накопление

Таблица 6

Урожай и содержание фосфора, калия и золы в биомассе хлореллы после восьми суток культивирования в нормальном питательном растворе

Питательный раствор в предшествующем опыте	Сухой вес, г/л	В %		
		P ₂ O ₅	K ₂ O	зола
Среда без азота	3,6	2,8	1,2	5,5
Контроль	4,2	3,2	1,2	5,8

Таблица 7

Содержание общего и белкового азота в сухой биомассе хлореллы

Питательный раствор в предшествующем опыте	Азот в %			Белок (белковый азот × 6,25)	Белковый азот в % от общего
	общий	белковый	небелковый		
Среда без азота	7,5	6,1	1,4	38,1	80
Контроль	7,6	6,6	1,0	41,3	87

небелкового азота выше, что, вероятно, связано с неодинаковым темпом усвоения азота и синтеза белка. Аналогичные данные получены и другими исследователями [12, 13, 14], доказавшими, что после азотного голодания водоросли начинают усваивать азот быстрее, чем в обычных условиях. Сначала увеличивается растворимый азот, затем нерастворимый.

Таблица 8

Содержание аминокислот в хлорелле при выращивании в питательной среде Тамия, %

Аминокислоты	Питательный раствор в предшествующем опыте	
	контроль	среда без азота
Лизин	2,8	2,6
Гистидин	1,6	1,5
Аргинин	2,5	2,3
Аспарагиновая кислота	3,0	2,5
Серин+глицин	4,3	3,0
Глютаминовая кислота	3,0	2,8
Треонин	2,5	2,5
Аланин	4,2	3,0
Тирозин	1,3	1,4
Метионин+валин	1,2	1,2
Фенилаланин	1,7	1,4
Лейцин+изолейцин	4,2	3,2
Сумма аминокислот	32,3	27,4

После азотного голодания в биомассе хлореллы увеличивается количество всех аминокислот (табл. 8), однако в течение 8-дневного

интенсивного культивирования в биомассе хлореллы количество всех аминокислот полностью не восстанавливается. По данным других исследователей, после азотного голодания перенесение водорослей в среду с азотом вначале вызывает усиленный синтез аланина и глутаминовой кислоты, а затем постепенно увеличиваются и другие аминокислоты [13, 14].

Выводы

1. При выращивании хлореллы в питательной среде Тамия сухой вес увеличивается с возрастом культуры. На 8-е сутки культуры, по сравнению с 4-суточной, наблюдается увеличение содержания фосфора, золы и некоторое уменьшение азота в биомассе. Отношение белкового азота к общему остается постоянным, почти не меняется и содержание калия.

2. При азотном голодании продолжается нарастание биомассы хлореллы, снижается в ней содержание фосфора, калия и золы. Азотное голодание сильно сказывается на накоплении азота и белка, уменьшается отношение белкового азота к общему.

3. После перенесения в полный питательный раствор хлорелла, которая до этого терпела азотное голодание, восстанавливает прирост биомассы и содержание в ней фосфора, калия и золы. Усиливается процесс накопления азотных соединений, как в виде белкового, так и небелкового азота.

4. Изучение аминокислотного состава хлореллы показывает, что 8-дневная культура хлореллы довольно богата аминокислотами. При азотном голодании, в связи с уменьшением содержания азота и белка в биомассе хлореллы, происходит снижение количества всех аминокислот, причем больше всего уменьшается количество аргинина. После перенесения хлореллы в питательный раствор с азотом в ее биомассе увеличивается содержание аминокислот, однако как количество отдельных аминокислот, так и их сумма меньше, чем в контрольном варианте.

Կ. Ա. ՄԻՔԱՅԵԼՅԱՆ, Մ. Ն. ԲԱՐՈՅԵԼՅԱՆ

ԱԶՈՏԻ ՍՈՎԻ ԱԶՆԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՔԼՈՐԵԼԼԱՅԻ ԱՃՄԱՆ ԵՎ ԲԻՈԲԻՄԻԱԿԱՆ
ԿԱԶՄԻ ՎՐԱ

Ա. մ. փ. n. փ. n. և մ.

Աշխատանքի նպատակն է եղել ուսումնասիրել ազոտի սովի ազդեցությունը քլորելլայի աճման և բիոքիմիական կազմի վրա: Ուսումնասիրել ենք նաև, թե քլորելլան նորմալ սննդաբար լուծույթ տեղափոխելուց հետո կարող է վերականգնել իր բերքատվությունը ու նախկին բիոքիմիական կազմը: Փորձերը կատարվել են լաբորատոր պայմաններում *Chlorella pyrenoidosa*-82 շտամի հետ:

կատարված հետազոտություններից կարելի է հանդել հետևյալ եզրակացությունները՝

1. Քլորելլայի բերքատվությունը, ծամիլայի սննդարար լուծույթում աճեցնելիս, մեծանում է ամառն օրերին զուգընթաց: Կենսազանգվածում նկատվում է ֆոսֆորի և մոլիբդենի պարունակությունը, սակայն սպիտակուցային ազոտի նույն ընդհանուր ազոտի պարունակությունը, 2-ի փոփոխվում նաև կարարերությունը ընդհանուրին մնում է անփոփոխ:

2. Ազոտի սուլի ժամանակ քլորելլայի բերքը շարունակում է մեծանալ, նրա կենսազանգվածում պակասում է ֆոսֆորի, կալիումի և մոլիբդենի պարունակությունը: Ազոտի սուլը խիստ անդրադառնում է քլորելլայի կենսազանգվածում ազոտի և սպիտակուցի պարունակության վրա, իջնում է սպիտակուցային ազոտի հարաբերությունը ընդհանուրին նկատմամբ:

3. Լրիվ սննդարար լուծույթ տեղափոխելուց հետո քլորելլան վերականգնում է իր նախկին բերքը և ֆոսֆորի, կալիումի և մոլիբդենի պարունակությունը: Ուժեղանում է ազոտի կուտակման պրոցեսը, սակայն սպիտակուցային ազոտի պարունակությունը մնում է ցածր մակարդակի վրա: Սպիտակուցային ազոտի պարունակությունը մնում է ցածր մակարդակի վրա:

4. Քլորելլայի 8 օրական կենսազանգվածը բավականին հարուստ է ամինթթվերով: Ազոտի սուլի ժամանակ ընդհանուր և սպիտակուցային ազոտի իջեցմանը զուգընթաց նկատվում է ամինթթվերի քանակի պակասում: Այս դեպքում ամինից շատ պակասում է արգինինի պարունակությունը:

5. Քլորելլան նորմալ սննդարար լուծույթ տեղափոխելուց հետո նկատվում է ամինթթվերի քանակի մեծացում, սակայն ստուգիչի համեմատ ավելի ցածր է ինչպես առանձին ամինթթվերի քանակը, այնպես էլ նրանց գումարը:

K. A. MIKAELIAN, M. M. BARSEGHYAN

THE INFLUENCE OF THE NITROGEN HUNGER ON THE GROWTH AND BIOCHEMICAL COMPOSITION OF CHLORELLA.

Institute of agrochemical problems and hydroponics of the Armenian Academy of Sciences, Erevan.

Summary

The experiments have been carried out in laboratory conditions with *Chlorella Pyrenoidosa*—82.

The results have been studied and the appropriate conclusions discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пиневич В. В., Верзилли Н. Н., Маслов Ю. И. Влияние различных источников азота на рост и накопление массы. Вестник ЛГУ, серия биол., № 9, в. 2. 1961.

2. Гаёвская Н. С. Проблемы использования одноклеточных водорослей. «Природа», № 4, 1956.
3. Spoehr H., Milner H. W. The chemical composition of *Chlorella*. Effect of environment conditions. *Plant Phys.*, 24, № 1, 1949.
4. Клячко-Гурвич Г. Л. и Семенов В. Е. Некоторые физиолого-биохимические аспекты направленного получения ценных метаболитов и веществ в условиях интенсивной культуры водорослей. Изучение интенсивной культуры водорослей, Прага, 1965.
5. Клячко-Гурвич Г. Л., Жукова Т. А. Изменение биосинтеза жирных кислот в условиях азотного голодания у *Chlorella pyrenoidosa*. «Физиология растений», т. 13, в. 1, 1966.
6. Клячко-Гурвич Г. Л. Направленный биосинтез углеводов. «Физиология растений», т. 11, в. 6, 1964.
7. Яаска В. Э. Зависимости продуктивности и химического состава некоторых штаммов протококковых водорослей от азотного питания. Автореферат. Тарту, 1965.
8. Кузнецов Е. Д. Особенности минерального питания хлореллы при недостатке азота. «Физиология растений», т. 13, в. 1, 1966.
9. Владимирова М. Г., Семенов В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. Изд-во АН СССР, 1962.
10. Микаелян К. А. Влияние азота, фосфора и серы в питательном растворе на рост и биохимический состав хлореллы. Сообщения Ин-та агрохимических проблем и гидропоники, № 8, 1967.
11. Сисакян Н. М., Безингер Э. Н., Шапошникова М. Г. Аминокислотный состав хлореллы (*Chlorella pyrenoidosa*). «Проблемы космической биологии», т. 1, 1962.
12. Thomas W. H., Krauss R. W. Nitrogen metabolism in *Scenedesmus* as effected by environmental changes. *Plant Phys.*, v. 20, № 2, 1955.
13. Syrett P. J. Nitrogen assimilation. (ed) Lewin Ralph A., Acadm. Press, 1962, New York, and London.
14. Томова Н. Г., Евстигнеева З. Г., Кретович В. Л. Ассимиляция нитратного и аммонийного азота у *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim 82. «Физиология растений», т. 11, в. 6, 1964.
15. Fowden L. Amino acid and proteins. Ed. Lewin Ralph A., Academic Press, 1962.