

УДК 581.1

## Использование урины в питании *Chlorella vulgaris*

**И.В. Грибовская\***, **Г.С. Калачёва,**  
**Л.С. Тирранен, А.А. Колмакова, Ю.И. Баянова**  
*Институт биофизики  
Сибирского отделения Российской академии наук,  
Россия 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50<sup>1</sup>*

Received 2.09.2011, received in revised form 9.09.2011, accepted 16.09.2011

*Исследовано влияние возрастающих концентраций нативной урины человека, NaCl, мочевины и NH<sub>4</sub>Cl на накопительную культуру *C. vulgaris*. Установлено, что предельными концентрациями для роста культуры являются добавки в питательный раствор 50 мл/л урины, 30 г/л NaCl, 800 мг/л мочевины, 20 г/л NH<sub>4</sub>Cl. Предложен питательный раствор для хлореллы, в состав которого входит кислотная вытяжка золы урины и нативная урина. Рассмотрены различные способы дополнительного введения азота в питательную среду: с HNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, мочевиной, нативной уриной. Определены оптимальные соотношения в предлагаемой среде для хлореллы водной вытяжки золы урины, нативной урины и HNO<sub>3</sub>. Приведены сравнительные данные о биохимических показателях биомассы контрольной и опытной накопительных культур *C. vulgaris*, а именно минеральный, аминокислотный, жирно-кислотный состав, содержание белков – жиров – углеводов, витаминов, относительно таковых для непрерывной культуры данной водоросли. Также выполнено сравнение этих показателей с таковыми для культур цианобактерий *Spirullina platensis* и *Oscillatoria deflexa*, выращенных в накопительном режиме.*

*Ключевые слова: урина, хлорелла, питание, сухая минерализация.*

Зеленая водоросль *Chlorella vulgaris* Beijer – долгожительница нашей планеты благодаря своей уникальной клеточной структуре. Интерес к хлорелле определяется богатейшим составом биологически активных веществ, высокой их концентрацией и сравнительно простой технологией получения

больших количеств биомассы. В последнее время интерес к ней связан еще и с тем, что водоросль можно рассматривать в качестве перспективного фотосинтетического компонента в системах жизнеобеспечения (СЖО) человека. В сельском хозяйстве суспензию водорослей вводят в корм свиней, птиц и рыб,

\* Corresponding author E-mail address: gribov@ibp.ru

<sup>1</sup> © Siberian Federal University. All rights reserved

используют в очистке сточных вод. В некоторых странах ее применяют для обогащения продуктов питания биологически ценными питательными веществами (Görs et al., 2010). Биомассу хлореллы широко используют и в фармакологии. Например, волокнистое вещество, из которого состоят стенки клеток, оказывает особый эффект на кишечник, стимулирует выработку интерферона, который обладает противораковым потенциалом ([www.healthywayproduction.com/encyclopedia.php?tem=225](http://www.healthywayproduction.com/encyclopedia.php?tem=225) 2010).

Показано, что хлорелла содержит в 5 раз больше хлорофилла, чем спирулина и люцерна. В процессе фотосинтеза водоросль использует до 12 % световой энергии, в то время как наземные растения – 1-2 % (Görs et al., 2010). Сверхпрочные стенки клетки позволяют ей быть устойчивой к действию различных токсических факторов. К тому же она обладает бактерицидными свойствами и способна нейтрализовать действие ядовитых веществ (Adams, 2004).

При оптимальных условиях роста хлорелла за сутки увеличивает свою массу в 4 раза. В светокультуре при непрерывном режиме выращивания получено до 40 г сухой массы/л, что позволяет эффективно использовать водоросль для регенерации атмосферы в СЖО (Гительзон и др., 1964). Липидная фракция хлореллы может достигать 20 % и более от сухой массы и является перспективной добавкой к биотопливу (Свидетельство регистр. N-ФС77 – 2009). Таким образом, полезность хлореллы для жизнедеятельности человека многообразна и незаслуженно мало используется в нашей стране.

В искусственных условиях хлореллу обычно выращивают на среде Тамия, где в качестве азотного питания предпочтителен нитрат калия ( $KNO_3$ ) (Гродзинский, Гродзинский, 1973). Однако она может расти и

на других формах азота: нитрате аммония ( $NH_4NO_3$ ), карбонате аммония ( $NH_4HCO_3$ ), мочеvine ( $(NH_2)_2CO$ ). Причем мочеvine наиболее пригодна для интенсивного культивирования хлореллы в нестерильных условиях альгобактериального ценоза (Гительзон и др., 1964). С учетом этих факторов, а также бактерицидных свойств водоросли представляется возможным использовать для минерального питания хлореллы нативную или окисленную урину. Известно выращивание хлореллы в непрерывной культуре (до 12 г сухой массы/л), где в качестве одного из источников биогенных элементов использовали урину человека (Базанова, Цхе, 1969). Авторы наблюдали накопление в биомассе натрия и кальция, а также дефицит фосфора и магния. В другой работе при непрерывном культивировании хлореллы использовали лиофилизированную урину человека, в соотношении 0,5 г сухого остатка/ г биомассы (Мелешко и др., 1969). В начале культивирования наблюдали прирост биомассы по сравнению с контролем, в дальнейшем продуктивность падала в результате отравления хлором. В исследованиях с использованием периодического режима выращивания и барботажа углекислотой питательным раствором культуры хлореллы служили суточные твердые и жидкие выделения кроликов, уток и человека (Баранов и др., 1964). Максимальная продуктивность хлореллы, 5 г сухой массы/л, была получена на разбавленных в 80-160 раз выделениях человека.

В нашей работе были поставлены следующие задачи: 1) изучить условия максимального использования окисленной и нативной урины человека для культивирования хлореллы; 2) определить биохимический состав биомассы опытной и контрольной накопительных культур *C. vulgaris*; 3) сравнить полученные биохимические показатели для накопительной культуры *C. vulgaris* с тако-

выми накопительных культур цианобактерий *Spirullina platensis* и *Oscillatoria deflexa* и непрерывной культуры *C. vulgaris*.

### Материалы и методы

Культуры *C. vulgaris* выращивали на лабораторном люминостате в накопительном режиме в нестерильных условиях альгобактериальной культуры с периодическим перемешиванием. Освещенность в люминостате в сумме составляла 6-7 клк в круглосуточном режиме. Поддерживали постоянную температуру  $33 \pm 1^\circ\text{C}$ . Продуктивность культуры оценивали по приросту веса сухой промытой биомассы, собранной в стадии стационарного роста на 12-е сутки культивирования.

Для культивирования контрольной культуры использовали среду Тамия. В состав опытных сред вводили добавки в зависимости от вида опыта. Так, в эксперименте по влиянию NaCl на рост хлореллы к среде Тамия добавляли NaCl в концентрациях в 10, 20 и 30 г/л. В эксперименте по влиянию нативной урины опытную культуру хлореллы выращивали на среде Тамия с добавлением урины человека в концентрации 10, 20, 30, 40 мл/л. Для определения влияния мочевины опытные культуры хлореллы выращивали на стандартной среде Тамия с добавками мочевины 200, 400, 600 и 800 мг/л. В следующей серии опытов нитратный азот (1,44 г/л N) стандартной среды Тамия был заменен на хлористый аммоний, концентрации которого увеличивали с 5,5 г/л (1,44 г/л N) до 19,1 г/л (5 г/л N). При этом содержание калия соответствовало стандартной среде Тамия за счет увеличения доли  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

В отдельной серии экспериментов опытные культуры водоросли выращивали на среде, приготовленной из водной вытяжки золы урины человека с добавками азота ( $\text{HNO}_3$ ) и нативной урины. Среду готовили следую-

щим образом. Проводили минерализацию урины. Для этого ее выпаривали в фарфоровых чашках до сухого остатка. Затем сухой остаток урины минерализовали в муфельной печи при 450-500 °С в течение 7 ч. Следует учесть, что зола урины, полученная в таких условиях, имела, как правило, серо-бурый цвет, что свидетельствовало о неполной ее минерализации. В ней оставались следовые количества азота. Затем делали водную вытяжку золы урины, т.е. к золе добавляли дистиллированную воду в объеме, равном изначальному объему урины, перемешивали и фильтровали. pH вытяжки составил 10-11, что могло отрицательно влиять на рост, так как для *C. vulgaris* оптимальный pH 5,3-5,4 (Гродзинский и др., 1973). Содержание общего азота, определяемого по методу Кьельдаля (Плешков, 1962), в водной вытяжке колебалось в пределах 10-20 мг/л, что было недостаточно для роста хлореллы. Затем pH вытяжки доводили до 5,0-5,3 добавлением 1,6-2,0 мл/л концентрированной азотной кислоты. Это добавляло в раствор до 0,41 г/л азота. Приготовленная таким образом кислотная вытяжка золы урины являлась основой культуральных сред опытной культуры *C. vulgaris*. Из-за недостатка азота и магния для полноценного роста водорослей к среде добавляли нативную урину в концентрациях 20-50 мл/л либо мочевины 100-300 мг/л.

Плотность культуры определяли весовым методом. Для этого ее центрифугировали, супернатант сливали, биомассу промывали дистиллированной водой в объеме исходно взятой культуры и повторно центрифугировали. Промытую биомассу хлореллы сушили в бюксах при 105 °С до постоянного веса. Для биохимических анализов использовали промытую сухую биомассу, за исключением метода определения липидов, где использовали промытую сырую биомассу.

Отбор проб культуральных сред (после центрифугирования культур) для микробиологических анализов проводили в стерильных условиях. Учитывали общее количество аэробных бактерий, бактерий группы кишечной палочки, микроскопических грибов. Используются общепринятые методы по их выделению на твердых селективных средах (Теппер и др., 2004; Нетрусов и др., 2005).

Содержание калия и натрия определяли на пламенном фотометре Flapho-4 (Carl Zeiss, Jena, Германия), содержание кальция, магния – методом атомной абсорбции на спектрофотометре AAS-1N (Carl Zeiss, Jena, Германия), микроэлементы: железо, марганец, медь, цинк – методом атомной абсорбции на спектрометре Квант-2А (Кортек, Россия). Фосфор определяли фотометрическим способом, используя фотоколориметр КФК-2 (ЛМО, Россия), серу – объемным методом с индикатором нитрохромазо (Кузнецов и др., 1968). Липиды экстрагировали из свежесобранной биомассы смесью изопропанол – хлороформ в отношении 1:1 (по объему). Жирные кислоты анализировали в виде метиловых эфиров на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором (GCD Plus, Hewlett Packard, США) (Kalacheva et al., 2001). Углеводы определяли антроновым методом, белок – по методу Лоури. Для определения аминокислотного состава проводили кислотный гидролиз сухой биомассы при 110 °С. Состав аминокислот анализировали на аминокислотном анализаторе KLA-3B (Hitachi, Япония) (Kalacheva et al., 2004). Витамины определяли общепринятыми методами (Скуркин, Шабаев, 1996). Количество органического вещества в культуральной среде хлореллы оценивали косвенно по химическому потреблению кислорода (ХПК) (Новиков и др., 1990).

## Результаты и обсуждение

В нативном виде урина содержит в своем составе до 17 г/л мочевины, 0,65 г/л аммонийных соединений, 3 г/л Na и 4,5 г/л Cl (Березов, Коровин, 2002). Эти элементы и вещества могут быть токсичными для некоторых видов высших и низших растений. Так, концентрация 2 г/л NaCl оказалась предельной для нормального роста пшеницы при выращивании в СЖО в субиригационном режиме на несменяемом питательном растворе, в состав которого входила нативная урина испытателей (Lisovsky et al., 1997). Мочевина при концентрации 0,2 моль/л и приводила к гибели вегетативных клеток почвенных цианобактерий (Зарипова, 2009). Токсическое действие хлористого аммония при концентрации  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  моль/л проявлялось в замедлении роста наземной части корней гороха (Мурзаева, 2000).

### *Влияние NaCl на рост хлореллы*

Для определения влияния NaCl (концентрации 10, 20, 30 г/л) на рост *C. vulgaris* был проведен эксперимент, результаты которого представлены в табл. 1. Очевидно, что увеличение концентрации NaCl до 30 г/л в среде существенным образом не отражалось на продуктивности хлореллы (различия с контролем не превышали 10 %). Вместе с ростом концентрации NaCl в среде увеличивалось его содержание в биомассе. В опыте концентрацией NaCl в среде 10 г/л концентрация натрия в промытой биомассе увеличилась в среднем в 6 раз, а в непромытой – в 17 раз по сравнению с контролем. При увеличении NaCl в среде до 30 г/л содержание натрия в промытых и непромытых клетках увеличивалось в 13 и 28 раз соответственно. Очевидно, что на поверхности клеток хлореллы адсорбировалось в 5-6 раз больше натрия, чем внутри

Таблица 1. Средние значения ( $\pm$  стандартная ошибка,  $n=3$ ) содержания натрия (% от сухой массы) в биомассе и биомассы культуры *Chlorella vulgaris* (г/л сухой массы) на 12-е сутки культивирования при разных концентрациях NaCl (г/л) в среде

Концентрация NaCl	Обработка биомассы	Содержание Na	Биомасса
10	промытая	1,57 $\pm$ 0,25	1,05 $\pm$ 0,06
	непромытая	10,80 $\pm$ 0,95	
20	промытая	2,60 $\pm$ 0,28	0,96 $\pm$ 0,04
	непромытая	14,00 $\pm$ 1,11	
30	промытая	3,18 $\pm$ 0,42	0,94 $\pm$ 0,05
	непромытая	17,20 $\pm$ 1,52	
контроль	промытая	0,25 $\pm$ 0,05	1,1 $\pm$ 0,06
	непромытая	0,62 $\pm$ 0,09	

клеток. Это позволяет выводить с биомассой из раствора существенную долю NaCl в несменяемых средах. В отличие от хлореллы цианобактерия *O. deflexa* в подобных условиях не накапливала Na (Грибовская и др., 2009). Благодаря этой особенности хлорелла представляется более привлекательным объектом по сравнению с цианобактериями для извлечения избытков NaCl из несменяемых растворов, используемых в системах жизнеобеспечения.

#### *Влияние нативной урины, мочевины и хлористого аммония на рост хлореллы*

При выращивании хлореллы на среде Тамия с добавлением урины установлено, что добавки в пределах 10-30 мл/л не только не снижали продуктивности культуры, а даже стимулировали ее рост (1,22  $\pm$  0,13 г сухой массы/л) по сравнению с контролем (0,94  $\pm$  0,09 г сухой массы/л). Однако добавки урины в концентрациях 30-40 мл/л были предельными, так как при более высокой ее концентрации плотность культуры была неоднородной, образовывались сгустки. Было сделано предположение, что увеличение продуктивности культуры при добавлении

урины в стандартную среду связано с увеличением концентрации мочевины.

Был выполнен эксперимент по определению влияния добавления мочевины к стандартной среде на рост хлореллы. Через 12 дней накопительного режима было зарегистрировано увеличение прироста хлореллы на 20-30 % (1,2 – 1,4 г сухой массы/л) по сравнению с контролем (0,98  $\pm$  0,14 г сухой массы /л) уже при добавлении в раствор 200 мг/л мочевины. Более высокие концентрации мочевины, до 800 мг/л, поддерживали рост, не вызывая угнетения. Следовательно, добавление к нитратной форме азота, входящей в состав среды Тамия, азота в виде мочевины в количестве 200 мг/л, способно улучшить продуктивность хлореллы. Известно, что хлорелла продуктивно растет на среде, где в качестве азотного питания используется мочевина в концентрации от 0,1 до 9,0 г/л в зависимости от плотности культуры (Гительзон и др., 1964). В отличие от хлореллы для цианобактерий *O. deflexa* и *S. platensis* мочевина в концентрации 100 мг/л была токсичной (Грибовская и др., 2009).

В следующей серии опытов нитратный азот (1,44 г/л N) стандартной среды Тамия был заменен на хлористый аммоний с кон-

Таблица 2. Средние значения ( $\pm$  стандартная ошибка,  $n=3$ ; г сухой массы/л) биомассы *Chlorella vulgaris* на 12-е сутки культивирования при добавлении хлористого аммония (г/л) к среде

Концентрация N ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) в среде*	Промытая биомасса
1,0	0,20 $\pm$ 0,05
2,0	0,25 $\pm$ 0,06
3,0	0,45 $\pm$ 0,09
4,0	0,95 $\pm$ 0,07
5,0	0,92 $\pm$ 0,08
Контроль**	0,94 $\pm$ 0,07

\* В среде Тамия азот -N ( $\text{KNO}_3$ ) заменен на  $\text{N}(\text{NH}_4\text{Cl})$ .

\*\* Среда Тамия [N ( $\text{KNO}_3$ ) -1,44г/л].

центрациями от 5,5 г/л (1,44 г/л N) до 19,1 г/л (5 г/л N). При этом содержание калия было сохранено на уровне среды Тамия за счет увеличения доли  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . При концентрациях азота 4,0 и 5,0 г/л N в форме хлористого аммония биомасса хлореллы была сравнима с таковой в контроле (табл. 2). Таким образом, хлорелла может расти при высоких дозах хлористого аммония (до 20 г/л), но эта форма азотного питания менее эффективна, чем нитраты или мочевины. Культуре *C. vulgaris* требуется сравнительно более высокое количество азота в аммонийной форме.

#### Выращивание хлореллы на средах, приготовленных на основе минерализованной урины

В таблице 3 приведен минеральный состав стандартной среды хлореллы, нативной урины, водной и кислотной вытяжек золы урины. Содержание K, P и S в урине человека было сравнимо со средой Тамия, т.е. этих элементов было достаточно для нормального роста культуры хлореллы. Отмечен избыток содержания в урине Na и Ca и недостаток Mg в сравнении со стандартной средой. Поскольку хлорелла способна выдерживать без замедления роста до 30 г/л NaCl, то данный избыток

Na в вытяжке не влиял на рост водоросли, так же как и кальций. Прирост биомассы хлореллы, выращенной на кислотной вытяжке золы урины, оказался в среднем на 40 % ниже, чем в контроле (табл. 4). Основными лимитирующими элементами в этой вытяжке были азот и магний. Дополнительно добавлять азот в виде азотной кислоты в вытяжку не представлялось возможным, поскольку pH среды становился менее 5, что пагубно действовало на рост водорослей. Следовательно, нужны добавки азота из других источников, предпочтительно из нативной урины либо мочевины, входящей в ее состав. Добавки  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  в кислотную вытяжку в количестве 100, 200 и 300 мг/л увеличивали продуктивность в среднем на одну и ту же величину, равную приросту биомассы в контрольном варианте (табл. 4). Следовательно, при плотности хлореллы около 1 г сухой массы/л достаточно добавлять к кислотной вытяжке 100-200 мг/л мочевины, чтобы удовлетворить потребность хлореллы в азоте. Коррекция среды магнием в виде  $\text{MgCO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  в концентрациях 0,5 г/л не давала устойчивого положительного результата.

Более экономично и целесообразно пополнять питательный раствор азотом, маг-

Таблица 3. Состав питательных сред на основе минерализованной урины, использованных для выращивания *Chlorella vulgaris* (среднее ± стандартная ошибка, n=3; г/л)

	K	Na	Ca	Mg	P	S	N	pH
Среда Тамия	2,22	-	-	0,25	0,22	0,33	0,69	5,3
Водная вытяжка зола урины	1,7±0,5	3,0±0,4	0,02±0,01	0,02±0,01	0,24±0,10	0,35±0,12	0,02	10-11
Кислотная вытяжка зола урины	1,7±0,3	3,1±0,3	0,04±0,02	0,03±0,01	0,27±0,06	0,36±0,04	0,43*	5,1
Кислотная вытяжка зола+30мл/л урины	1,8±0,3	3,3±0,4	0,05±0,01	0,06±0,02	0,29±0,04	0,38±0,03	0,61**	5,4
Урина ***	1,0-2,1	2,0-4,0	0,07-0,16	0,07-0,13	0,60-0,87	0,21-0,54	3,8-5,6	6-7

\* 0,41 г/л N с HNO<sub>3</sub> +0,02 г/л N с золой.

\*\* 0,43 г/л N исходно в вытяжке + 0,18 г/л N с уриной.

\*\*\* Литературные данные (Березов, Коровин, 2002).

Таблица 4. Средняя биомасса культур *Chlorella vulgaris* (± стандартная ошибка, n=3, г сухой массы/л), культивируемых на контрольной и опытных средах с добавками нативной урины или мочевины, на 12-е сутки культивирования

Среда	Биомасса
Контроль (Тамия)	0,95±0,06
Опытная *	0,57±0,05
Опытная + 20 мл/л урины	0,92±0,15
Опытная + 30 мл/л урины	0,90±0,09
Опытная + 40 мл/л урины	0,95±0,07
Опытная + 50 мл/л урины	0,98±0,08
Опытная + 100мг/л мочевины	0,92±0,07
Опытная +200 мг/л мочевины	0,90±0,06
Опытная +300 мг/л мочевины	0,94±0,05

\* Кислотная вытяжка зола урины.

нием и микроэлементами введением в кислотную вытяжку от 20 до 40 мг/л нативной урины (табл. 4). Объем добавляемой урины зависел от количественного содержания в ней азота, фосфора и магния. Известно, что содержание элементов в урине варьирует в зависимости от питания, при этом минимальные и максимальные значения могут отличаться более чем в 2 раза (Березов, Коровин, 2002). Если содержание минеральных элементов в урине высоко, то достаточно

добавить 20 мл урины/л, чтобы обеспечить прирост биомассы, близкий к контролю (табл. 4). Но более надежна была добавка 30 – 40 мл нативной урины на 1 л кислотной вытяжки. При этом удовлетворялась потребность во всех недостающих элементах. При добавлении нативной урины в расчете 50 мл/л кислотной вытяжки продуктивность культуры хлореллы не снижалась, но ухудшались ее микробиологические показатели (табл. 5).

Таблица 5. Количество микроорганизмов (КОЕ/мл) и ХПК<sup>о</sup> (О<sub>2</sub> г/л) в культуральных средах (А) и в смыве с клеток (Б) *Chlorella vulgaris*

Среда	Общее количество аэробных бактерий, x10 <sup>3</sup>		Бактерии группы кишечной палочки, x10 <sup>2</sup>		Грибы		ХПК
	А	Б	А	Б	А	Б	А
Контроль	300	200	180	0	0	0	0,38
Кислотная вытяжка золы урины + 20 мл/л урины	560	140	40	0	0	0	0,44
Кислотная вытяжка золы урины +50 мл/л урины	1780	640	600	0	480	60	0,56

#### Микробиологические показатели культур хлореллы

Как отмечалось, опыты с хлореллой проводили без соблюдения условий стерильности. Исследовали микробиологический состав культуральной среды *C. vulgaris* в эксперименте с использованием среды на основе кислотной вытяжки золы урины с добавками 20 мл/л (опыт 1) и 50 мл/л (опыт 2) нативной урины, а также в контроле (среда Тамия). Количество аэробных бактерий в культуральной среде опытов 1 и 2 было выше, чем в контроле, в среднем в 2 и в 6 раз соответственно (табл. 5). В смыве с биомассы разница в количестве аэробных бактерий между контролем и обоими опытами была существенно ниже (в 1,4 и 3 раза соответственно). Бактерии группы кишечной палочки были обнаружены в культуральных средах, причем в опыте 1 в наименьшем количестве. В смывах биомасс контроля и опытов их обнаружено не было. Грибы отсутствовали в смыве биомассы и в культуральной среде контроля и опыта 1, тогда как в опыте 2 их присутствие было зафиксировано. Таким образом, при добавлении в кислотную вытяжку 20 мл/л нативной урины микробиологический состав среды можно считать близким к контролю. При добавлении в среду 50 мл урины /л среды количество микроорганизмов (грибы, аэробные бактерии) существенно возрастало.

Химическое потребление кислорода культуральной среды опытов 1 и 2 превысило контроль в 1,2 и 1,5 раза соответственно (табл. 5). Таким образом, наряду с количеством микроорганизмов при добавлении 50 мл/л урины значительно увеличивалось содержание органического вещества в среде.

#### Биохимические показатели биомассы культур хлореллы

Было рассмотрено влияние культуральной среды, содержащей вытяжку урины, на минеральный и биохимический состав биомассы хлореллы. В опыте в качестве культуральной среды использовали кислотную вытяжку золы урины с добавлением 30 мл/л нативной урины, а в контроле – среду Тамия. В таблице 6 приведены сравнительные данные содержания минеральных элементов в биомассе опытной и контрольной культур *C. vulgaris*. Содержание большинства элементов в опыте и контроле было близким, за исключением более высоких уровней натрия, кальция и железа в опыте, т.е. опытная культура *C. vulgaris* не испытывала дефицита элементов по сравнению с контрольной. Зольность биомассы из опытной и контрольной культур была высокой и, в среднем, близкой по величине (16,5 и 16,1 % соответственно), при этом превосходила зольность цианобактерий *O. deflexa*



Таблица 6. Минеральный состав биомассы культур *Chlorella vulgaris* (% от сухой массы)

	Контроль*	Опыт**
K	0,65±0,04	0,72±0,08
Na	0,16±0,03	0,76±0,12
Ca	0,04±0,01	0,16±0,08
Mg	1,20±0,11	1,0 ±0,07
P	2,10±0,15	2,00±0,54
S	0,51±0,02	0,52±0,08
N	5,40±0,52	4,9 ±0,83
Fe	0,18±0,03	0,56±0,04
Mn	0,08±0,01	0,09±0,01
Cu	0,015±0,005	0,010±0,003
Zn	0,08±0,014	0,08±0,01

\* Среда Тамия.

\*\* Кислотная вытяжка золы урины+30 мл/л урины.

и *S. platensis* (13,5 % и 11 % соответственно) (Грибовская и др., 2009).

Существенных различий в содержании белков, липидов и углеводов в биомассе водоросли в опыте и контроле выявлено не было (табл. 7). При сравнении биохимического состава исследуемой накопительной культуры *C. vulgaris* с данными непрерывной культуры (Трубачев и др., 1976) обнаружены следующие различия: содержание белков оказалось в среднем на 12,5 % больше, а углеводов – на 90 % меньше. Количество же липидов было близким и находилось на уровне 21,5 % от сухой массы. В отличие от хлореллы содержание липидов в периодических культурах цианобактерий *O. deflexa* и *S. platensis* не превышало 14 %, тогда как содержание белков и углеводов было близким к исследуемой культуре (Грибовская и др., 2009). Интерес сравнения биохимических составов хлореллы и цианобактерий связан с тем, что и те и другие могут быть использованы не только в качестве фотосинтезирующего звена СЖО,

но и для пищевых цепей, включающих рыб и человека.

В таблице 7 представлены данные по содержанию витаминов и провитаминов в опытной и контрольной накопительных культурах *C. vulgaris* в сравнении с литературными для непрерывной культуры данной водоросли. Содержание провитаминов А (каротина и каротиноидов) в опытной культуре было на 22-23 % ниже, чем в контрольной. Однако уровни провитаминов А в опыте были близки с таковыми в непрерывной культуре *C. vulgaris* (табл. 7). Содержание витамина Е в опытной хлорелле было высоким, 109 мг %, что на 15 % выше, чем в контроле, и почти на порядок выше его содержания в непрерывной культуре (Баянова, Трубачев, 1987). Содержание витамина В1 в непрерывной культуре оказалось в среднем в 2,5 раза выше, чем в накопительной культуре, в отличие от витамина В2 (11,2 мг%), накопление которого было предпочтительным в исследуемом режиме культивирования. Что касается уровней исследуемых

Таблица 7. Биохимический состав биомассы культур *Chlorella vulgaris* (среднее± стандартная ошибка, % от сухой массы)

Компоненты	Режим культивирования		
	накопительный		непрерывный <sup>1,2,3</sup>
	контроль	опыт	
Белки	59,0±1,4	57,8±2,3	50,6
Липиды	19,8±0,9	21,6±1,4	21,5
Углеводы	9,0±0,5	8,7±0,6	16,6
Каротин, мг%	225,5±6,4	184,6±5,3	166,0
Каротиноиды, мг%	423,0±23,5	343,8±19,8	311,0
Витамин Е, мг%	93,5±12,2	109,0±15,6	14,0
Витамин В1, мг%	1,7±0,1	1,8±0,2	4,3
Витамин В2, мг%	11,3±0,5	11,2±0,4	5,9

Примечание. Опыт, контроль – пояснения даны в табл. 6;  
1 – Трубочев и др., 1976; 2 – Барашков, 1972; 3 – Баянова, Трубочев, 1987

витаминов у *C. vulgaris* и цианобактерий, то *C. vulgaris* выигрывала по накоплению в биомассе витамина Е (у *O. deflexa* 40 мг%) и витамина В2 (у *O. deflexa* и *S. platensis* – 5,1 и 6,6 мг% соответственно) (Грибовская и др., 2009).

В таблице 8 представлен аминокислотный состав биомассы *C. vulgaris*. Сумма незаменимых аминокислот в опытной накопительной культуре была на 8 % выше, чем в контроле, и на 13 % ниже, чем в непрерывной культуре (Трубочев и др., 1976). Наибольшие различия отмечены для цистина и метионина. Их содержание в непрерывной культуре было в среднем на 70 % выше, чем в накопительной. Очевидно, синтез и накопление этих аминокислот более интенсивно происходят в молодых клетках *C. vulgaris*. Сумма незаменимых аминокислот в исследуемой водоросли *C. vulgaris* несколько уступала таковой культур цианобактерий *S. platensis* (в 1,4 раза) и *O. deflexa* (в 2 раза) (Грибовская и др., 2009).

В таблице 9 представлен состав жирных кислот (ЖК) липидов исследуемой водоросли.

Относительное содержание жирных кислот в опытной и контрольной биомассе существенно не различалось. Следует отметить относительные высокие уровни  $\alpha$ -линоленовой кислоты в опытной и контрольной культурах, 27,5 % от суммы ЖК, по сравнению с данными для непрерывной культуры хлореллы – 16,8 % (Калачева и др., 1974). Соответственно, выше на 20 % была и сумма незаменимых жирных кислот. Сравнение с составом ЖК периодических культур цианобактерий *O. deflexa* и *S. platensis* также оказалось в пользу опытной культуры *C. vulgaris*, так как сумма ее незаменимых ЖК превосходила таковые у цианобактерий в среднем в 2 раза (Грибовская и др., 2009).

Полученную в опытных условиях культуру хлореллы с плотностью до 1 г сухой массы/л можно использовать в кормовых целях в сельском хозяйстве и рыбоводстве, для очистки сточных вод, а в СЖО в цепи питания: хлорелла – дафнии – рыбы. Повышенное содержание в ней липидов позволяет рассматривать ее как один из возможных источников биотоплива. В случае исполь-

Таблица 8. Аминокислотный состав биомассы культур *Chlorella vulgaris* (% от сухой массы)

Аминокислота	Режим культивирования		
	накопительный		непрерывный <sup>1</sup>
	контроль	опыт	
Лизин	1,90	2,16	2,57
Гистидин	0,72	1,06	0,78
Аргинин	2,11	2,42	3,33
Аспарагиновая	3,34	3,82	4,08
Треонин	1,90	2,12	2,10
Серин	1,60	1,82	2,09
Глутаминовая	4,30	4,93	5,64
Глицин	2,13	2,45	2,73
Аланин	3,00	3,32	3,95
Цистин	0,13	0,19	0,59
Метионин	0,17	0,26	0,93
Валин	2,09	2,38	2,33
Изолейцин	1,33	1,52	1,53
Лейцин	3,19	3,54	3,83
Тирозин	2,02	2,31	1,35
Фенилаланин	2,02	2,01	1,90
Сумма незаменимых аминокислот	12,73	13,73	15,78

Примечание. Незаменимые для человека аминокислоты выделены жирным шрифтом; контроль, опыт – пояснения даны в табл. 6; 1 – Трубачев и др., 1976

зования ее в составе фотосинтезирующего звена СЖО потребуется непрерывный режим культивирования с продуктивностью 10 и более г сухой массы/л. В этом случае также возможно использование предлагаемого способа питания хлореллы. Но при этом следует соответственно увеличивать добавление минерализованной урины и азотной кислоты.

### Заключение

Предложен доступный способ выращивания накопительной культуры *C. vulgaris* плотностью до 1 г сухой массы/л с использованием в качестве культуральной среды кислотной вытяжки золы урины с добав-

лением нативной урины, дополняющей недостающие элементы: азот, магний и др. Анализ биохимического состава опытной накопительной культуры *C. vulgaris* в сравнении с контролем и непрерывной культурой, а также с периодическими культурами цианобактерий выявил некоторые ее преимущества: увеличенное содержание витамина Е, суммы незаменимых жирных кислот, зольности, липидов. Остальные показатели исследуемой культуры *C. vulgaris*, такие как содержание незаменимых аминокислот, витаминов В1, В2, каротина и каротиноидов, минеральный состав, были сравнимы с контрольной культурой. Из рассмотренных источников азота в пита-

Таблица 9. Состав жирных кислот биомассы культур *Chlorella vulgaris* (% от суммы ЖК)

Кислота	Режим культивирования		
	накопительный		непрерывный <sup>1</sup>
	контроль	опыт	
12:0	0,04	0,03	-
14:0	0,08	0,06	0,7
i15:0	0,11	0,04	-
15:0	0,21	0,20	-
i16:0	0,03	0,07	-
16:0	24,5	24,6	29,3
16:1 $\omega$ 9	1,7	1,4	-
16:1 $\omega$ 7	0,9	0,7	0,3
t $\Delta$ 3-16:1	2,8	2,7	1,7
16:2 $\omega$ 4	4,9	5,0	-
16:3 $\omega$ 1	0,3	0,2	-
16:3 $\omega$ 3	11,4	11,2	10,5
16:4 $\omega$ 1	0,3	0,2	-
17:0	0,2	0,2	-
18:0	1,9	0,9	0,1
18:1 $\omega$ 7	0,8	0,8	-
18:1 $\omega$ 9	4,3	3,9	3,5
18:2 $\omega$ 6	17,5	19,7	22,5
18:3 $\omega$ 3	27,5	27,5	16,8
18:2 $\omega$ 6 + 18:3 $\omega$ 6	45,0	47,2	39,3

Примечание. Контроль, опыт – пояснения даны в табл. 6, незаменимые для человека жирные кислоты выделены жирным шрифтом; 1 – Калачева, Трубачев, 1974

нии хлореллы, наряду с нативной уриной, перспективно добавление к водной вытяжке золы урины мочевины. Причем достоинством в первом случае являлась доступ-

ность и дешевизна добавки азота с уриной, а во втором – отсутствовал риск микробиологического заражения и накопления органического вещества.

### Список литературы

Базанова М.И., Цхе А.А. (1969) О сбалансированной среде для выращивания хлореллы с применением мочи в качестве источника минерального питания. Докл. конф. Биология и культивирование микроорганизмов. Красноярск, Изд-во СО АН СССР, с. 117-120.

Баранов С.А., Ян Н.А., Одинцова М.А., Глазачева И.В. (1964) Опыт культивирования микроводорослей на выделениях некоторых животных и человека в условиях накопительных культур. В: Управляемое культивирование микроводорослей. М.: Наука, с. 86-97.

Барашков Г.К. (1972) Сравнительная биохимия водорослей. М.: Пищевая промышленность, 326 с.

Баянова Ю.И., Трубачев И.Н. (1987) Сравнительная оценка витаминного состава некоторых одноклеточных водорослей и высших растений, выращенных в искусственных условиях. Прикладная биохимия и микробиология. 17(3): 400-407.

Березов Т.Т., Коровин Б.Ф. (2002) Биологическая химия. М.: Медицина, 704 с.

Гительзон И.И., Терсков И.А., Ковров Б.Г., Войтович Я.В., Садикова Г.И. (1964) О формах азотного питания хлореллы в условиях непрерывного культивирования. М.: Наука, с. 47-55.

Грибовская И.В., Калачева Г.С., Баянова Ю.И., Колмакова А.А. (2009) Физиолого-биохимические свойства цианобактерии *Oscillatoria deflexa*. Прикладная биохимия и микробиология. 45(3): 261-276.

Гродзинский А.М., Гродзинский Д.М. (1973) Краткий справочник по физиологии растений. Киев: Наукова думка, с. 49.

Зарипова Л.Х. (2009) Биология и экология почвенной цианобактерии *Cylindrospermum michailovskense* (Суанопрокарыота). Дис. канд. биол. наук. Уфа. 194 с.

Калачева Г.С., Жила Н.О., Волова Т.Г. (2001) Липиды зеленой водоросли *Botryococcus* в ходе стадийного развития в периодической культуре. Микробиология 70(1): 1-8.

Калачева Г.С., Трубачев И.Н. (1974) Липиды *Chlorella vulgaris* в условиях блокирования биогенными элементами. Физиология растений. 21(В.1): 56-60.

Кузнецов В.И., Басаргин Н.Н., Мясищева Л.Г. (1968) Усовершенствование метода определения серы в растительных объектах по Шенигеру. Агрохимия. 3: 134-137.

Мелешко Г.И., Лебедева Е.К., Илгач Г.В., Казаков А.И. (1969) Использование лиофилизированной мочи для длительного выращивания хлореллы с возвратом среды. Материалы VI Рабочего совещания по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. Киев: Наукова думка, с. 71-72.

Мурзаева С.В. (2000) Индуцирование антиоксидантных ферментов в растениях гороха избытком хлористого аммония. Изв. Самаркандского научного центра Российской академии наук. 2(2): 348-357.

Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. (2005). Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений. М.: Академия, 608 с.

Новиков Ю.В., Ласточкина К.О., Болдина З.Н. (1990) Методы исследования качества воды водоемов. М.: Медицина, с. 47-49.

Плешков Б.П. (1962) Практикум по биохимии растений. М: Колос, с. 3-7.

Свидетельство регистр. N-ФС77-20242 (2009) Биотопливо из водорослей. Коммерческая биотехнология.

Скуркнин В.Н., Шаббаев С.В. (1996) Методы анализа витаминов А, D, Е и каротиноидов в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства. М.: Химия, 96 с.

Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. (2004) Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов. М.: Дрофа, 256 с.

Трубачев И.Н., Гительзон И.И., Калачева Г.С., Барашков В.И., Белянин В.Н., Андреева Р.И. (1976) Биохимический состав сине-зеленых водорослей и хлореллы. Прикладная биохимия и микробиология. 2: 196-202.

Adams M. (2004) Supper Food for Optimum Health: *Chlorella* and *Spirulina*. Tucson, Consumer Willness Res. Center, P.1-39.

Görs M., Schumann R., Hepperle D., Karsten U. (2010) Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. J. Appl. Phycol. 22(3): 265-276.

<http://www.healthywayproduction.com/encyclopedia.php?tem=225> Chlorella vulgaris 2010.

Kalacheva G.S., Gubanov V.G., Gribovskaya I.V., Gladchenko I.A., Zinenko G.K., Savitsky S.V. (2002) Chemical analysis of Lake Shira water (1997-2000). Aquatic Ecol. 36(1): 123-141.

Kalachova G.S., Kolmakova A.A., Gladyshev M.I., Kravchuk E.S., Ivanova E.A. (2004) Seasonal dynamics of amino acids in two small Siberian reservoirs dominated by prokaryotic and eukaryotic phytoplankton. Aquatic Ecol. 38(1): 1-14.

Lisovsky G.M., Gitelson I.I., Shilenko M.P., Gribovskaya I.V., Trubachev I.N. (1997) Direct utilization of human liquid wastes by plants in closed ecosystem. Adv. Space Res. 20(10): 1801-1804.

## **Use of Urine in the Nutrition of *Chlorella Vulgaris***

**Iliada V. Gribovskaya,  
Galina S. Kalachova, L.S. Tirranen,  
A.A. Kolmakova, Yu.I. Bayanova**

*Institute of Biophysics  
of Siberian Branch of the Russian Academy of Science,  
50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

---

*We have studied the effect of increasing concentrations of human native urine, NaCl, urea and NH<sub>4</sub>Cl on the batch culture of *Chlorella vulgaris*. It was found that the concentration threshold for the culture growth were addition of 50 ml/l of urine, 30 g/l of NaCl, 800 mg/l of urea, and 20 g/l of NH<sub>4</sub>Cl to the medium. A culture medium for *Chlorella* was suggested containing the acid extract of urine ash and native urine. Several ways of nitrogen addition to the experimental solution of *Chlorella* were considered: HNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, urea and native urine. The optimal ratios of urine ash water extract, native urine and HNO<sub>3</sub> in the medium solution were determined to maintain *Chlorella* growth. Comparative data were given on the biochemical values of the biomass of the *C. vulgaris* batch and continuous cultures according to the following parameters: mineral, amino acid and fatty acid contents, proteins, lipids, carbohydrates and vitamins. The values were also compared to those in cultures of cyanobacteria *Spirulina platensis* and *Oscillatoria deflexa* grown in the batch mode.*

*Keywords: urine, *Chlorella*; nutrition, dry mineralization.*

---