



ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ԱԳՐՈՔՐԵՄԻԱՅԻ ԼԱՐՈՐԱՏՈՐԻԱ

Ն. Պ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

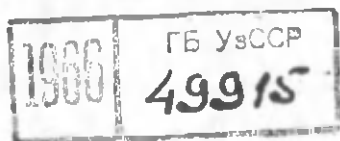
Մ Ի Ա Բ Ջ Ի Ջ
Կ Ա Ն Ա Ջ Ջ Ր Ի Մ ՈՒ Թ Ն Ե Ր Ի
Մ Շ Ա Կ ՈՒ Թ Յ ՈՒ Ն Ը

ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԱ ՀՐԱՏԱՐԱԿԱԳՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆ 1966

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР
ЛАБОРАТОРИЯ АГРОХИМИИ

Н. П. АРУТЮНЯН

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЕННЫХ
ВОДОРΟΣЛЕЙ



✓
53574

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН

1966

Работа представляет собой обзор большинства исследований, проведенных за период 1932—1963 гг., по методам культивирования одноклеточных зеленых водорослей как в лабораторных условиях, так и под открытым небом с учетом экономики их выращивания.

Книга предназначена для технологов и научных работников, в частности микробиологов, биохимиков, физиологов растений, работающих в области выращивания водорослей и других фотосинтезирующих одноклеточных, а также для студентов биологических и сельскохозяйственных ВУЗов и техникумов.

ПРЕДИСЛОВИЕ

За последнее десятилетие большое внимание уделяется вопросу экономического обоснования культивирования одноклеточных зеленых водорослей в искусственной среде. Результаты исследований, проведенных с целью установить оптимальные условия выращивания указанных культур, обобщены в работе Института Карнеги (*Algal Culture from laboratory to Pilot Plant, 1953*) [1] и в докладах Научно-исследовательского института Станфорда (*Proceedings of the World Symposium on Applied Solar Energy, 1956*) [2]. Предварительные работы в этой области, проведенные в Советском Союзе, подытожены в тезисах докладов Всесоюзного совещания в Ленинграде (Всесоюзное совещание по культивированию одноклеточных водорослей, 1961 [3]).

Изучение современных достижений по культуре водорослей показывает, что в настоящее время оно развивается в трех основных направлениях:

а) массовое культивирование одноклеточных зеленых водорослей для получения продуктов питания, кормов и специальных органических веществ;

б) массовое культивирование азотфиксирующих сине-зеленых водорослей для повышения плодородия почвы;

в) симбиотическое размножение одноклеточных зеленых водорослей и аэробных бактерий для обезвреживания бытовых и промышленных вод с дальнейшим использованием растительного планктона.

Каждое из этих трех направлений развивается не только посредством свойственной данной культуре техники, но и путем использования определенных родов и видов одноклеточных водорослей. Разные по своим целям, эти три направления имеют много общих задач, связанных с физиологией и биохимией водорослей.

При использовании одноклеточных водорослей (рис. 1) в качестве удобного объекта проведены многочисленные исследования в области фотосинтеза, обмена веществ и процессов воспроизведения, результаты которых обобщены рядом авторов [4—8]. Ознакомление с этими трудами, безусловно, может быть полезным для выяснения вопросов, относящихся к культуре водорослей.

Настоящая работа посвящена современным достижениям в области первого из вышеупомянутых трех направлений культивирования водорослей. Автор надеется, что она внесет посильную лепту в массовое культивирование одноклеточных зеленых водорослей с целью получения пищевого и промышленного сырья.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Исследования массового культивирования одноклеточных водорослей приводят к заключению, что ускорение роста этих водных культур искусственным способом обусловлено в основном четырьмя факторами:

- 1) концентрацией CO_2 и минеральных элементов в питательной среде;
- 2) способом освещения;
- 3) регулированием температуры;
- 4) перемешиванием среды, которое должно обеспечить равномерное распределение CO_2 , питательных веществ и света в растворе.

Углеродное и минеральное питание

При культивировании одноклеточных зеленых водорослей в лабораторных условиях (рис. 2 и 3) CO_2 вводится в раствор в смешанном с воздухом или в чистом виде. Концентрация CO_2 в питательном растворе обусловлена устройством культурального сосуда и интенсивностью перемешивания раствора.

Для неплотных суспензий скорость роста хлореллы не зависит от концентрации CO_2 в продуваемом возду-

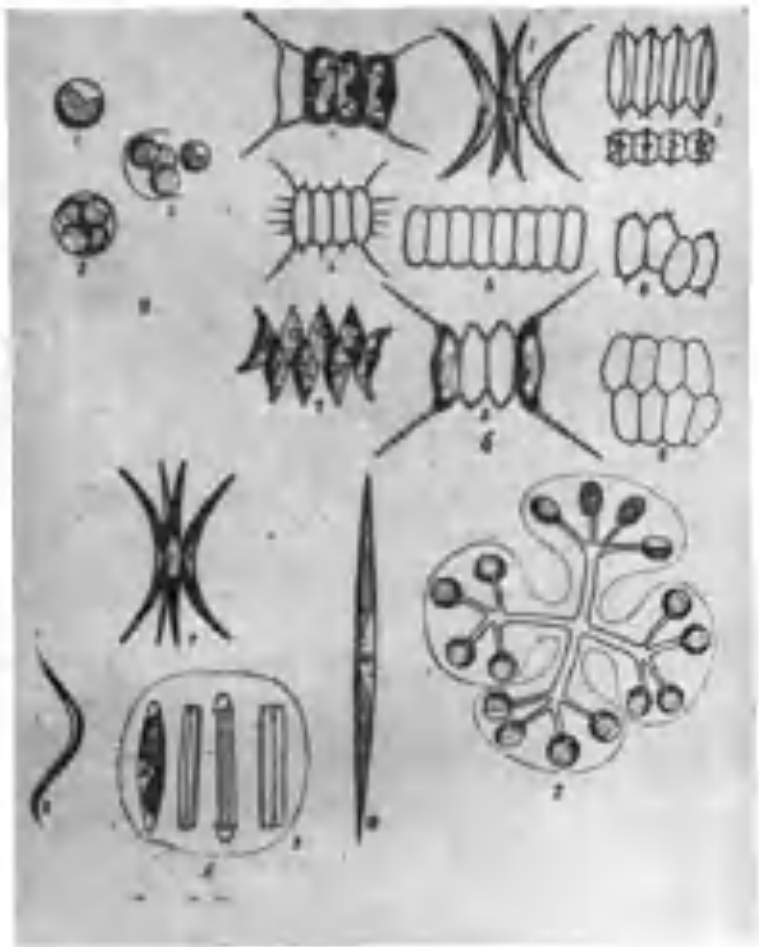


Рис. 1. Некоторые представители протококковых водорослей (Фон. В.—Algenkunde, Iena, 1959). а—*Chlorella vulgaris*: 1—взрослая клетка, 2—образование автоспор, 3—выход автоспор; б—виды *Scenedesmus*: 1—*S. quadricauda*, 2—*S. acuminatus*, 3—*S. brasiliensis*, 4—*S. abundans*, 5—*S. bijugatus*, 6—*S. denticulatus*, 7—*S. obliquus*, 8—*S. opoliensis*, 9—*S. eornis* var. *disciformis*; в—виды *Ankistrodesmus*: 7—*A. falcatus*, 8—*A. angustus*, 9—*A. pfitzerii*, 10—*A. acticularis*; г—*Dictyosphaerium pulchellum*.

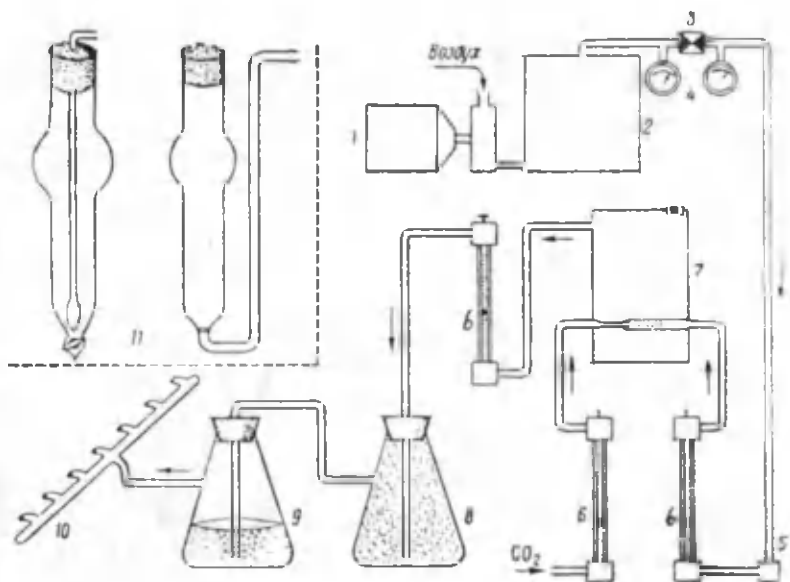


Рис. 2. Схема лабораторной установки для выращивания водорослей (М. Г. Владимиров и В. Е. Семененко, 1962) [131]. 1—компрессор; 2—ресивер; 3—редуктор; 4—манометр; 5—кран для регулировки скорости подачи воздуха в смеситель; 6—ротаметры; 7—смеситель воздуха с CO_2 ; 8—стерильный ватный фильтр; 9—увлажнитель; 10—гребенка; 11—сосуды для культивирования водорослей.

хе, вплоть до 0,03% [9]. По нашим опытам, при интенсивном продувании раствора только воздухом (2 л/л л/мин.) и регулировании его pH в пределах 6—7 низкая концентрация CO_2 в воздухе не ограничивает рост водорослей до определенной плотности культуры (400 млн. кл/мл [130]). При уплотнении культуры и сильном поглощении углекислого газа равновесие поступления CO_2 не сохраняется между жидкой и газовой фазами и раствор постепенно становится менее насыщенным углекислым газом. По этой же причине углекислый газ смешивают с воздухом с постепенно нарастающей концентрацией (0,5—5,0%).

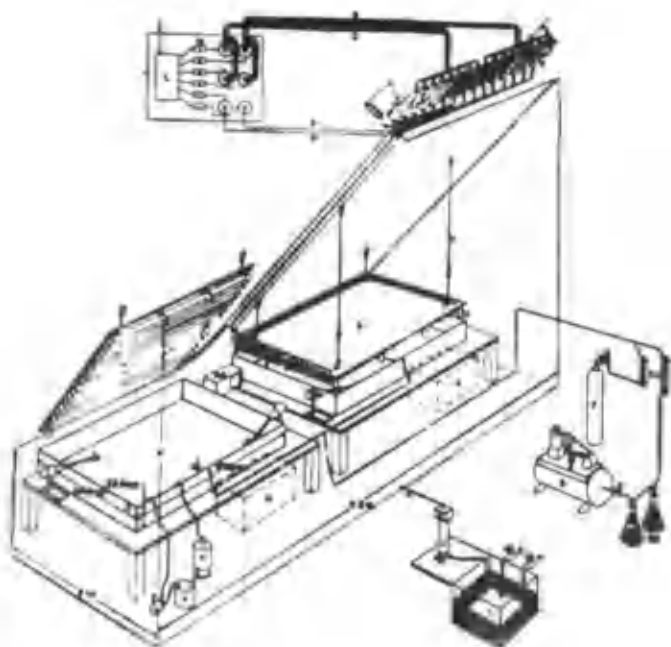


Рис. 3. Схема оборудования для выращивания одноклеточных водорослей в лабораторных условиях, с регулированием освещения и температуры среды (R. W. Krauss a. W. H. Thomas, 1954) [17]. А — фанерный чан, окрашенный в белый цвет и покрытый полиэтиленовой пленкой; В — пропеллер (из нержавеющей стали), прикрепленный к мотору; С — пористая труба для подачи CO_2 ; D — компрессор; E — клапан; F — баллон углекислого газа; G — кран для холодной воды; H — кран для горячей воды; I — ванночка; J — ионообменная колонка; K — кондиционеры воздуха; L — доска для регулирования освещения; M — пускатели по отдельным агрегатам; N, O — электропроводки к батарее флуоресцентных ламп; P, Q — электропроводки к батарее накаливающих ламп; R — 430 миллиамперные балласты; S — рефлектор; T — белые флуоресцентные трубки; H — накаливающие охлаждаемые лампы; V — развнчивающая цепь; X — центрифуга; Y — резервуарик; Z — насос; AA — воднотермограф; BB — ватный и стекловолоконный фильтры; CC — ротаметры.

Более высокие концентрации считаются токсичными, несмотря на то, что в опытах Джогегана хлорелла (*Chlorella vulgaris* varietes *viridis*) выращивалась успешно даже тогда, когда концентрация CO_2 в продуваемом воздухе равнялась 20% [10].

Фотосинтетическая активность одноклеточных зеленых водорослей не обусловлена степенью кислотности питательного раствора (для хлореллы в пределах pH 4,6—8,9) при насыщенности его углекислым газом [86].

Ряд исследователей пытался вводить углекислый газ косвенно, смешивая с раствором неорганических или органических соединений углерода. В опытах с заменой углекислого газа карбонатами или бикарбонатами скорость роста хлореллы сильно снижается, так как эта водоросль поглощает углекислый газ в недиссоциированном состоянии (CO_2 или H_2CO_3) [24], а проницаемость ее оболочки незначительна для ионов CO_3^{2-} или HCO_3^- , диссоциируемых этими соединениями углерода в щелочной среде.

Одноклеточные зеленые водоросли рода сценедесмус Остерлинд [11] выращивал бикарбонатом, взамен CO_2 . Однако пока еще не доказано, что ускорение роста культур одноклеточных зеленых водорослей возможно посредством бикарбоната (как единственного источника углерода). Из органических соединений углерода (сахара, спирты, органические кислоты) д-глюкоза (декстроза), как источник углеродного питания, влияет на динамику роста хлореллы в наибольшей мере [87, 88]. В условиях слабого освещения среды глюкоза значительно стимулирует темп роста хлореллы. Однако он повышается в очень незначительной степени при увеличении интенсивности света [89].

Опыты Пруса и сотрудников доказали, что для ускорения размножения хлореллы использование глюкозы взамен CO_2 в условиях слабого освещения питательной

среды и сильного продувания воздуха даст ощутимые результаты [75]. Когда суспензия насыщена светом и CO_2 , глюкоза не увеличивает скорость роста культуры. Последняя увеличивается благодаря использованию глюкозы лишь тогда, когда активность фотосинтеза ограничена недостатком CO_2 [90].

Результаты опытов, проведенных нами с целью установить значение разных способов углеродного питания на скорость роста хлореллы, показали, что темпы карбоавтотрофного, карбогетеротрофного и миксотрофного роста культуры—соответственно K_a , K_g , K_m —в начальном периоде роста, т. е. когда плотность культуры сравнительно низкая (до 500 тыс. клеток/мл), выражаются в следующем порядке: $K_m \geq K_a > K_g$, а затем, с повышением плотности культуры (300 млн/мл и больше), сравнение темпов роста выражается в порядке $K_g \geq K_m > K_a$. Иными словами, скорость гетеротрофного роста хлореллы превосходит скорость его автотрофного роста тогда, когда интенсивность фотосинтеза ограничивается недостатком освещения плотной культуры [130].

О разнице потребности одноклеточных зеленых и сине-зеленых водорослей в неорганических элементах имеется богатая литература [1—3, 12, 13, 17, 18]. В сточных водах одноклеточные водоросли размножаются гетеротрофным, миксотрофным и автотрофным питанием [12, 22].

Предложенные для культивирования одноклеточных водорослей различные растворы (Тамия, Майерса, Дейвиса, Крег-Трилиза и других) сходны с растворами Кнопла, Бейеринка и Молиша, где общая концентрация солей приблизительно равна 0.02 M (приложение 1). В опытах Спера и Милнера максимальное количество биомассы получено при общей концентрации солей в растворе 0,063 M [92].

**СПИСОК НАИБОЛЕЕ УПОТРЕБЛЯЕМЫХ СРЕД
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОТОКОККОВЫХ
ВОДОРΟΣЛЕЙ [131]**

Среда Тамия

KNO_3	— 5,0 г/л
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 2,5 "
KH_2PO_4	— 1,25 "
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,003 "
Раствор микроэлементов	— 1 мл (см. ниже)
ЕДТА (этилендиаминотетрауксусная кислота)	— 0,037 г/л

Среда Прата

KNO_3	— 0,1 г/л
K_2HPO_4	— 0,01 "
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,01 "
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	— 0,001 "

*Среда Чо-10**

$Ca(NO_3)_2$	— 0,04 г/л
K_2HPO_4	— 0,01 "
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,025 "
Na_2CO_3	— 0,02 "
Na_2SiO_3	— 0,025 "
$FeCl_3 \cdot 6H_2O^{**}$	— 0,0008 "

*Среда Крейга-Трилиза**

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 14,100 г/л
KNO_3	— 1,600 "
KH_2PO_4	— 1,400 "
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,008 "
К лимоннокислый	— 0,008 "

или

Fe лимоннокислый	— 0,0033 "
Лимонная кислота	— 0,0033 "

Раствор микроэлементов — 1,00 мл

Среда Майерса

KNO_3	— 1,213 г/л
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 1,204 "
KH_2PO_4	— 1,224 "
$Fe_2(SO_4)_3$	— 0,0747 "
Раствор микроэлементов	— 0,2—0,5 мл/л

Среда Бенке (для сине-зеленых)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,1 г/л
$Ca(NO_3)_2$	— 0,5 "
K_2HPO_4	— 0,2 "
Fe лимоннокислый	— 0,0033 "
Лимонная кислота	— 9,0033 "

Среда Кюпа (применяется в разведениях 1/2, 1/4, 1/10)

KNO_3	— 0,1 %
$Ca(NO_3)_2$	— 0,01 "
K_2HPO_4	— 0,02 "
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,01 "
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	— 0,0001 "

Среда Ягужинского

KNO_3	— 0,5 г/л
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	— 0,1 "
Na_2HPO_4	— 0,2 "
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	— 2 мг/л

* Применяется в разведениях.

** Заменяется в модификации { Fe—лимоннокислый—0,0033 г/л
Лимонная кислота—0,0033 г/л

Раствор микроэлементов

H_3BO_3	— 2,86 г/л
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	— 1,81 .
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	— 0,222 .
MoO_3	— 176,4 мг/10 л
NH_4VO_3	— 229,6 .

Некоторые виды одноклеточных водорослей растут в узких пределах концентраций неорганических солей [14], а одноклеточные зеленые водоросли хлорелла и сценедесмус могут расти в широких пределах плотности тех же элементов. Например, в растворе Тамия концентрация нитрата калия, сульфата магния и фосфата калия соответственно в 50, 125 и 250 раз выше, чем в растворе Прата. Из микроэлементов борная кислота, сульфат цинка, хлорид марганца и окись молибдена соответственно используются в 40-, 4000-, 8- и 400-кратно больших дозах, чем в растворе Дейвиса [5].

При выборе концентрации макро- и микроэлементов следует учитывать, с какой целью размножаются одноклеточные водоросли: для получения белков или жиров, лекарственных веществ, витаминов или хлорофилла. Спер и Милнер [92] впервые показали, что из одного и того же вида хлореллы можно получить такую биомассу, которая была бы богата преимущественно белками (до 58% сухой массы) или преимущественно жирами (до 83% сухой массы; последнее получается, когда водоросли выращиваются в условиях сильно недостаточного азотного питания). Опытами Майерса доказано, что изменение концентрации основных солей (KNO_3 , KH_2PO_4 , MgSO_4) в пределах 0,001—0,02 М не влияет на скорость роста хлореллы [1]. Это обстоятельство очень важно для массового выращивания водорослей в производственных условиях. Однако при теоретическом изучении для сохранения устойчивого темпа роста культур необходимо

концентрацию солей и ионов водорода поддерживать на определенном уровне. Самым легким способом является замена старого раствора новым в одинаковые промежутки времени [16]. Более рациональным является метод, предложенный Краусом [17, 18], по которому питательные элементы периодически добавляются к раствору каждый раз в том количестве, в каком усвоено водорослями. Скорость ассимиляции каждого питательного элемента определяется периодическими анализами раствора и выращенных в ней водорослей.

Для выращивания одноклеточных зеленых водорослей в лабораторных условиях устойчивым темпом Кук [19] и Майерс [20, 21] применили технику, основанную на ином принципе. Используемые ими оборудования (рис. 4) поддерживают плотность суспензии в определенных пределах посредством электрического тока, передаваемого фотоэлементом, который активизирует соленоидный затвор. Он периодически пропускает свежий раствор, который, вливаясь в культуральный сосуд, вытесняет оттуда суспензию водорослей до тех пор, пока плотность оставшейся суспензии уменьшится и интенсивность света, проникающего с одной стороны сосуда на другую, будет достаточной для повторной зарядки фотоэлемента. Затем культура вновь уплотняется и, доходя до определенной степени плотности, снова препятствует проникновению света,— фотоэлемент перестает передавать электрический ток и соленоидный затвор автоматически отключается от бака и снова пропускает свежий раствор [21]. Темп роста изученной культуры $K = \frac{1}{V} \frac{\Delta V}{\Delta t}$ измеряется тем количеством суспензии $\frac{\Delta V}{\Delta t}$ (где V —неизменяемый объем раствора в сосуде), которое вытеснено из сосуда в течение определенного времени [21].

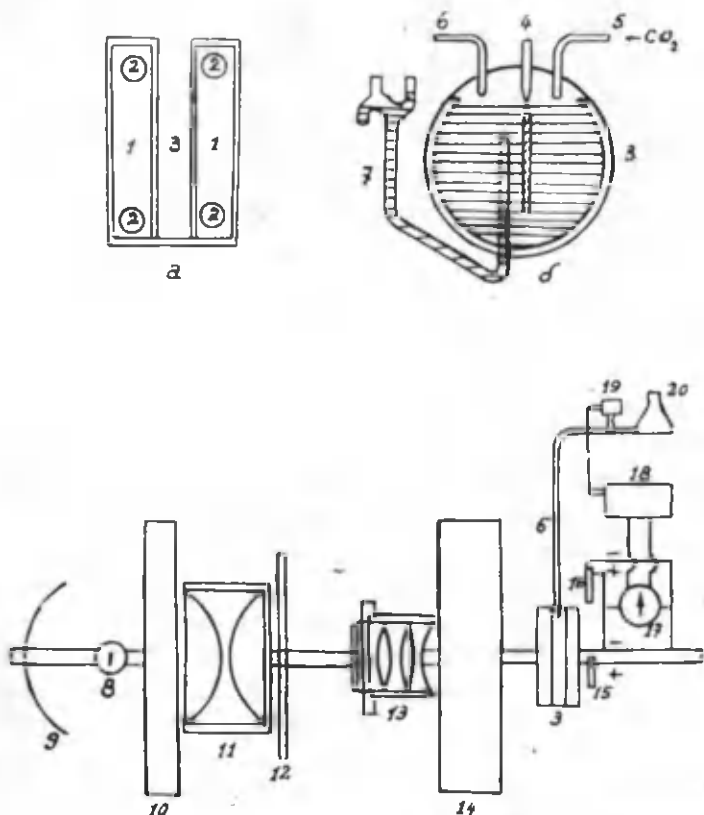
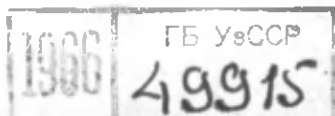


Рис. 4. Схема аппарата для непрерывного культивирования одноклеточных водорослей с автоматическим регулированием плотности суспензии (J. N. Phillips a. J. Myers, 1954) [32]. а—культиватор (3) расположен между двумя прозрачными камерами (1), изготовленными из оргстекла. Термостабильная вода непрерывно циркулирует через отверстия (2); б) поперечный разрез культиватора (3), в котором вращается вертикальная винтовая мешалка (4); 5—подача углекислого газа на поверхность культуры; 6—свежий раствор периодически льется в культиватор, вытесняя оттуда суспензии водорослей через сифонную трубку (7), которая поддерживает объем культуры постоянным; 8—14—оптические приспособления для регулирования интенсивности и температуры светового потока; 15, 16—фотоэлементы; 17—гальванометр; 18—электронное реле; 19—автоматический клапан; 20—свежая питательная среда.

Культуры, выращенные в определенных пределах плотности, регулируемых фотоэлектрическим способом, с течением времени также могут нарушить первоначальный состав питательной среды, вследствие неравномерной ассимиляции различных питательных элементов. Следовательно, для поддержания устойчивого темпа роста культур необходимо постоянно следить, чтобы состав среды своевременно регулировался бы в соответствии с динамикой ассимиляции каждого элемента. Что касается микроэлементов, то известно, что для одноклеточных зеленых водорослей разница между полезными и токсичными дозами этих веществ очень небольшая. Поскольку обычными методами химического анализа невозможно с достаточной точностью постоянно следить за скоростью потребления микроэлементов, трудность обеспечения культур, выращиваемых устойчивыми темпами, соответствующими дозами микроэлементов устраняется благодаря использованию комплексообразующих веществ, самым известным из которых является трилон-Б—этилендиаминтетрауксусная кислота. Благодаря этому стало возможным использовать микроэлементы более значительными дозами, чем те дозы, которые перенесли бы водоросли без этих веществ. Совместное применение высоких концентраций микроэлементов и комплексообразующих веществ равносильно частому обновлению питательного раствора.

В проведенных по обезвреживанию сточных вод исследованиях изучается динамика симбиотического размножения водорослей и бактерий путем выращивания этих культур устойчивым темпом двумя способами. Первый из этих способов заключается в том, что из культуры, растущей в стеклянном цилиндре с продуванием воздуха, ежедневно берется определенное количество суспензии, которое устанавливается скоростью роста культуры



в данных условиях, а взамен прибавляется свежая сточная вода в равном количестве со взятой суспензией [22]. Сущность второго способа заключается в том, что одноклеточные водоросли и бактерии выращиваются по замкнутой системе, без продувания воздуха, в аппарате, называемом симбиоконом [23]. В этом случае, в культуральный сосуд непрерывно течет сточная вода, количество которой равно постоянному количеству вытекаемой обезвреженной воды.

Изучение роста культур в условиях непрерывного освещения

Большинство имеющихся в литературе данных относительно ускоренного размножения одноклеточных зеленых водорослей получено в условиях применения оптимальных концентраций CO_2 и питательных элементов. В подобных условиях скорость роста культур обусловлена температурой и интенсивностью света, падающего на каждую клетку суспензии. Последняя, в свою очередь, обусловлена плотностью суспензии.

В неплотных суспензиях, где на каждую клетку падает больше света, чем эта клетка может использовать, рост культур протекает в логарифмической фазе; его можно выразить формулой $\frac{dN}{dt} = E \times N$ или $\frac{d \log N}{dt} = E$,

где N —количество клеток в суспензии, E —константная величина. В плотных суспензиях свет, падающий на каждую клетку, полностью используется, однако не удовлетворяет потребностям клетки в световой энергии. По этой причине рост культуры протекает в линейной фазе и выражается формулой $\frac{dN}{dt} = I \times A$, где A — освещен-

2100A

ная поверхность суспензии, L —константная величина. E и L —функции температуры и интенсивности света, падающего на поверхность культуры.

Тамия экспериментально доказал, что в общем процессе роста и развития хлореллы (*Chl. ellipsoidea*) активность метаболических процессов, не зависящих от светового фактора, обусловлена температурой культуральной среды в значительно большей мере, чем активность фотосинтеза [25]. Иными словами, при сравнительно высокой температуре (25°—35°C) скорость размножения водорослей обусловлена главным образом интенсивностью фотосинтеза, а при низкой температуре (7°—15°C)—процессом обмена веществ.

Майерс изучил темпы роста различных родов одноклеточных зеленых и сине-зеленых водорослей в логарифмической фазе, в условиях непрерывного освещения [1, 4]. По таблице, приведенной автором [26], сине-зеленые водоросли *Anacystis nidulans* размножаются быстрыми темпами — $K = \frac{1}{t} \log \frac{N_1}{N_0} = 4,2$, где t — продолжительность логарифмической фазы в днях, N_0 —число клеток в каждом миллилитре суспензии в начале опыта. N_1 —число клеток в каждом миллилитре суспензии в конце опыта. Это значит, что каждая клетка этих водорослей в день может образовать до 16 000 новых клеток (в условиях непрерывного освещения). Из той же таблицы видно, что один штамм, принадлежащий виду хлореллы (*Chlorella ellipsoidea*) при различных условиях температуры, имеет следующие темпы размножения ($K=0,09$ (7°C), $K=0,48$ (15°C) и $K=1,2$ при 25°C), стало быть, каждая клетка этих водорослей может образовать соответственно 1, 2, 3 и 16 новых клеток.

Темпы роста культур в линейной фазе обычно принято выражать дневной прибавкой урожая, весом сухой биомассы, полученной с каждого квадратного метра освещенной поверхности культуры, в граммах. В лабораторных условиях одноклеточные водоросли обычно культивируются в условиях непрерывного освещения, между тем культуры, выращенные в естественных условиях, подвержены повседневному прерыванию света (день, и ночь). Следовательно, для сравнения скорости роста культур одноклеточных водорослей в лабораторных и естественных условиях более удобно выразить темп роста весом сухой биомассы, полученной с каждого квадратного метра в течение 12 часов.

Для определения темпа роста культуры можно подсчитать также коэффициент использования световой энергии. Его определяют путем составления соотношения калорийности биомассы, полученной за единицу времени, и интенсивности света, поглощенного (фотосинтезируемого) культурой. Каждый грамм сухой массы хлореллы содержит 5,5—5,8 больших калорий [10, 27, 28]. Фотосинтезируемым считается тот свет, длина волны которого находится в пределах 370—700 м μ .

Эффективность использования световой энергии можно подсчитать этим методом как в логарифмической, так и в линейной фазах роста культуры. Однако поскольку в открытых, как и в закрытых системах массового культивирования водорослей продолжительность логарифмической фазы роста по сравнению с продолжительностью линейной фазы очень коротка, то эффективность использования световой энергии принято определять в линейной фазе, когда падающая на культуры физиологически активная световая энергия полностью используется ими.

Таблица I

Темпы роста хлореллы, выращенной в условиях различной интенсивности света и при различных температурах (в линейной фазе), и коэффициент использования световой энергии (культуры выращены в условиях искусственного освещения)
(таблица дана по Тамия [6])

Одноклеточные зеленые водоросли	Способ выращивания культуры	Интенсивность света (килолюкс)	Температура по °C	Темп роста в линейной фазе г/м ²	Коэффициент использования световой энергии в %	Литературные источники
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Турбулентная культура	75	25	43	7,1	29
	Культура, перемешанная посредством продувания воздуха	75	25	25	4,1	
<i>Chlorella</i> штамм А	Культура, перемешанная механической силой	30	32	9,7	4,7	27
		4,1	24	3,9	13,3	
		3,4	32	2,6	10,9	
<i>Chlorella vulgaris</i> var. <i>viridis</i>	Культура, перемешанная посредством продувания воздуха	14	25	7,7	20	10
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Культура, перемешанная посредством продувания воздуха	50	25	32	7,9	16
			15	14	3,4	
			7	0	0	
		25	25	14	17,2	
			15	7,5	9,2	
			7	2,5	3,1	
		5	25	8,2	20,2	
			15	6,5	16,0	
			7	1,8	4,4	
		2	25	3,9	24,0	
			15	3,6	22,0	
			7	1,3	8,0	

Эффективность использования световой энергии подсчитана на основе видимой солнечной радиации и посредством следующих двух положений:

а) 1 г сухой массы одноклеточной зеленой водоросли содержит 5,5 килокалорий;

б) в пределах 400—700 м μ длины волн света килोलюкс равен 0,0062 калории (см²) в минуту.

Данные, помещенные в табл. 1, получены различными авторами при выращивании хлореллы в лабораторных опытах в различных световых и температурных условиях. По ним можно заметить, что в указанных пределах интенсивности света и температуры ускорение темпа роста хлореллы в линейной фазе прямо пропорционально повышению температуры и интенсивности света.

По данным таблицы, темп роста культуры достигает максимума в пределах интенсивности освещения 50—70 тыс. люменов, при 25°C. В этих условиях за каждые 12 часов с каждого квадратного метра освещенной поверхности культуры получено по 32—43 г водорослей (вес сухой биомассы). Если бы было возможно в условиях солнечного освещения добиться подобной эффективности использования световой энергии (7,1—7,9%, см. таблицу), то за год можно было бы получить по 1100—1500 ц урожая с каждого гектара обработанной водной площади (при подсчете среднедневной продолжительности солнечного освещения в 12 часов). Сопоставление приведенных в таблице данных убедительно показывает, что эффективность использования световой энергии увеличивается с повышением температуры, однако, в отличие от темпа роста, она снижается, когда повышается интенсивность освещения [27, 28].

Обширные исследования Б. Кока [30] в Голландии показали, что в условиях искусственного освещения эффективность использования световой энергии у хлорел-

периода освещения, то наблюдалось синхронное и регулярное по срокам деление клеток в темноте.

Изменение интенсивности освещения и температуры, значительно действует на процесс синхронизации культур. В опытах Пирсона и Сенгера [102], при перемежающихся периодах света и темноты (16 ч.: 12 ч.), полная синхронизация культуры (*Chlorella pyrenoidosa* 211—86 Prings.) получалась при освещении интенсивностью 5000 лк и температуре 30°C. При 9000 лк и 20°C культура синхронизировалась только частично, а при освещении в 5000 лк и температуре 30°C культура десинхронизировалась. Удачный подбор освещения и темноты имеет решающее значение для увеличения продуктивности синхронных культур. В опытах Пирсона и Лоренсена [103] в синхронных культурах хлореллы (*Chl. pyrenoidosa* штамм Эмерсона) при периодах света и темноты 12 : 12, освещении в 2000 лк и 30°C число клеток увеличивалось вдвое, а при 9000 лк и 30°C—втрое. Одновременно увеличивался и средний объем зрелых клеток перед делением: при освещении в 2000 лк этот объем равнялся 165 μ^3 , а при 9000 лк—210 μ^3 . Понижение температуры этой же культуры до 25°C приводило к повышению ее продуктивности: число клеток увеличивалось в пять раз, а средний объем клетки равнялся 270 μ^3 . При повышении температуры и интенсивности освещения до 30°C и 15000 лк число клеток увеличивалось в восемь раз (почти все клетки делились на 8 автоспор), а максимальный их объем перед наступлением деления достигал 330 μ^3 .

Поданным Пирсона и Лоренсена [103], плотность культуры не оказывает никакого влияния на синхронное развитие клеток. Однако вследствие ослабления интенсивности света, проникающего в глубь плотной суспензии, процент делящихся клеток в плотных культурах, по сравнению с неплотными, довольно низок.

Из разных методов получения исходного материала для синхронного культивирования водорослей (чередования свето-темновых циклов [25, 35, 99—108] выращивания культуры в течение нескольких суток в условиях очень низкой интенсивности освещения [6, 36]—200 до 800 лк—с последующим фракционирующим центрифугированием) физическое отделение клетки соответственно величине путем естественного процесса седиментации является наиболее быстрым, простым и универсальным. По этому методу [109], автотрофная культура любой плотности, любого штамма и вида рода хлореллы, выращенная в любых условиях освещения и темноты, сливается в узкий цилиндр и оставляется на некоторое время в темноте (чтобы воспрепятствовать росту и развитию клеток). Вследствие естественного процесса седиментации культура расслаивается на ясно отграниченные слои, причем в верхнем слое остаются одни только аутоспоры, объем которых наименьший по сравнению с остальными клетками, находящимися на других стадиях развития. Через день-два верхний слой суспензии осторожно сливается или отбирается пипеткой и используется в качестве исходного материала для выращивания синхронной культуры. В отличие от вышеупомянутых сильнодействующих методов синхронизации, этот метод не влияет на нормальное физиологическое состояние клеток. По данным его автора, культура, полученная из подобных аутоспор, развивается в дальнейшем при соответствующих условиях вполне синхронно.

Благодаря современной технике синхронизации в аппаратах непрерывного культивирования (при которой все или почти все клетки находятся на одной стадии развития) стало возможно провести подробные изучения химического состава [100, 104, 110—121] и физиологичес-

кой активности [36, 38, 105, 108, 122—128] клеток в определенные стадии их развития.

Исследования, проведенные в настоящее время на синхронных культурах, с целью определить условия максимального роста и накопления биомассы водорослей в процессе фотосинтеза, а также выяснить факторы, являющиеся ингибиторами клеточного деления, намечают путь к дальнейшей интенсификации культур одноклеточных зеленых водорослей.

тов отметим следующие системы выращивания культур:

а) культуры, «барботирующие» потоком воздуха и углекислого газа (bubbling cultures), которые выращивались в больших стеклянных бутылках или в баллонах [24, 32, 47], в бетонных корытах [48], в вертикальных или наклонных стеклянных сосудах [29, 49], в вертикальной плоской камере с прозрачными стенками [10] и в наклонном в сторону солнца стеклянном цилиндре, установленном на вертикальном стержне [19];

б) культуры, перемешанные механической силой, которые выращивались в больших чанах [50] или бетонных резервуарах [27];

в) культуры, перемешанные насосами, выращенные в длинных пластмассовых и стеклянных трубах [16, 29] или в поддоне [129];

г) взбалтываемые культуры, которые выращивались в качающихся поддонах [29].

Для максимального увеличения освещенной поверхности культур по отношению к их объемам [51, 94], а также для «распространения» солнечного света в глубь культур [1, 2], кроме вышеуказанных систем, был предложен еще ряд других. Однако большинство этих предложений по причине их непрактичности в производственных условиях остались неосуществленными.

Из этих предложений отметим.

1. Установки с зигзагообразной поверхностью, наклоненной в сторону солнца, по которой суспензия водорослей стекает тонким слоем, принимая солнечный свет с неполной интенсивностью [70].

2. Прозрачные стеклянные трубы, погруженные вертикально во всю толщу культуры. В этих трубах помещаются конусообразные приспособления верхушками вверх для отражения солнечного света в горизонтальном направлении [52].

лопастей и пропеллера. Южные стенки этих бассейнов — органическое или неорганическое стекло. Остальные стенки окрашены белой поливиниловой краской. Изме-

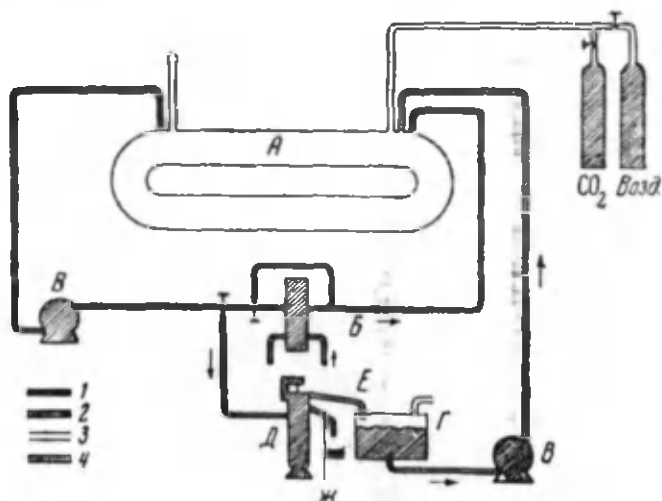


Рис. 66. Принципиальная схема американской установки для массового культивирования водорослей по системе закрытой циркуляции (A. W. Fisher и A. D. Little, 1953) [78]. А — полиэтиленовый контейнер; Б — теплообменное устройство; В — насосы; Г — смеситель питательной среды; Д — суперцентрифуга; Е — ввод очищенной от водорослей среды в рециркуляцию; Ж — выход отцентрифугированной биомассы водорослей.

рения, проведенные в период выращивания культур, показали, что интенсивность света, падающего на южную стенку, в летний период слабее по сравнению с интенсивностью света, падающего на горизонтальную поверхность. В зимние месяцы от южной стенки получается столько света, сколько на горизонтальной поверхности. Благодаря тепловой инерции большой массы воды температура культур в этих бассейнах при разной погоде удерживается на сравнительно устойчивом уровне — в преде-

лах, благоприятных для жизнедеятельности водорослей. Результаты проведенных в Израиле опытов показывают, что для превращения этой системы выращивания в более эффективную необходимо плотность культур довести до очень высокого уровня и постоянно поддерживать его, а глубину культурной среды регулировать в зависимости от величины разных факторов внешней среды.

г. Система открытой циркуляции, где культура выращивается в неглубоких, круглых ($D=3-20$ м) или четырехугольных бассейнах (рис. 7). Посредством насоса из бассейна непрерывно выкачивается определенное количество суспензии, которая обогащается смесью воздуха и CO_2 и через вращающиеся или движущиеся на поверхности раствора перфорированные трубки снова возвращается в бассейн. Давление жидкости, вытекающей из отверстий косых выступов, направляет вперед, в горизонтальном направлении, вышеуказанные неслообразные трубы и, непрерывно двигая их на поверхности раствора, одновременно перемешивает культуру [55].

Для массового выращивания одноклеточных зеленых водорослей под открытым небом в 1959—1962 годах в Ленинградском университете испытывались разные типы установок, принадлежащих к системам открытой и закрытой циркуляции (рис. 8 и 9). Эти установки подробно описаны в литературе [81]. Перемешивание культур, выращенных открытой системой, проведено разными способами (каскадная циркуляция, турбулентный круговорот посредством насоса, перемешивание с помощью мешалок лопастного типа или посредством укрепленных на горизонтальной оси гребных винтов или вращающихся вокруг вертикальной оси водяных турбинок). В этих установках CO_2 вносился в растворы по установленным на дне бассейна перфорированным полиэтиленовым трубкам, изготовленным из органичес-

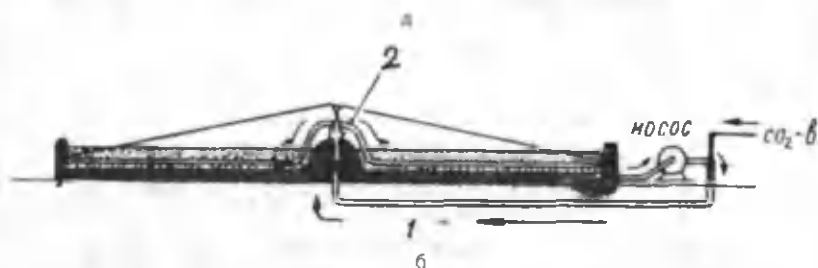


Рис. 7. Снимок (а) и схема работы (б) круглого бассейна для выращивания одноклеточных зеленых водорослей по системе открытой циркуляции в Японии (И. Tamia, 1955) [55]. Насос забирает суспензию из бассейна и перекачивает ее обратно по трубе (1) и по трубкам вращающейся насадки (2).

кого стекла колоколообразным сосудам и непосредственно под крыльчатку водяной турбины или под гребной винт. Углекислый газ подавался в чистом виде в количестве 0,05—0,1 л/м² в минуту. По данным авторов, эффективность использования CO₂ была низкая—8—15%. Из



Рис. 8. Каскадная установка (В. А. Чесноков и др., 1959) [81].



Рис. 9. Горизонтальные установки для выращивания одноклеточных водорослей (В. В. Пиневиц и Н. Н. Верзилин, 1962) [81].



Рис. 10. Компонентные круглые бассейны для выращивания одноклеточных водорослей в производственном масштабе в Японии (Н. Nakamura, 1961) [83].

литературы известно, что при подаче CO_2 в сравнительно больших количествах (в Японии 0,2—0,5 л/м² мин.) иногда эффективность его использования достигает 30% [46, 47, 58].

Кроме культур, выращиваемых в глубоких бассейнах, во всех других системах культивирования водорослей глубина раствора колеблется в пределах 5—20 см (в условиях Ленинграда оптимальная глубина культуры считается 8—12 см).

До 1962 года приготовленные для массового культивирования одноклеточных зеленых водорослей самые просторные бассейны находились на территории Японского научно-исследовательского института микроводорослей, близ Токио (рис. 10). Эти бассейны занимали 0,4 га водного пространства. Там культуры выращивались вышеописанной (я) системой открытой циркуляции.

Селекционные работы

Для поднятия производительности культур одноклеточных зеленых водорослей до высокого уровня не менее важное значение имеют селекционные работы. До настоящего времени селекционные работы проводились в основном по отбору быстро растущих, устойчивых к изменениям различных факторов внешней среды штаммов. Исследования по отбору и разведению водорослей, имеющих хорошие показатели химического состава и питательной ценности, пока что не заняли достойного им места, несмотря на то, что эти работы столь же важны. Выбор системы выращивания культур под открытым небом должен соответствовать признакам данного штамма одноклеточных зеленых водорослей, так как проявление тех или иных признаков штамма обусловлено системой выращивания культуры. Целью селекционных работ в области водорослеводства является также выявление таких штаммов, которые:

а) устойчивы к заражению в том смысле, что они не только не уничтожаются разными вредными микроорганизмами (протозои, грибки, бактерии), но и не дают возможности им размножаться (благодаря своей особенности несравненно быстрого размножения в данных условиях освещения, температуры и питания), вследствие чего эти вредные организмы постепенно лишаются необходимых жизненных условий и погибают [59];

б) в процессе обмена веществ на поверхности раствора образуют сравнительно небольшое количество пены и не выделяют антибиотических веществ, отрицательно влияющих на их рост (как, например, хлореллин) [60, 61];

в) имеют клетки не очень крупные и не очень мелкие, чтобы не было надобности применять дополнительную энергию 1) для перемешивания суспензии (крупные клетки более склонны к оседанию на дне бассейна), 2) для отделения биомассы от жидкости (сбор культур, состоящих из мелких клеток, как центрифугой, так и способом искусственной седиментации сложен тем, что клетки отделяются с большим трудом).

Для выращивания культур под открытым небом обычно используются одноклеточные зеленые водоросли, принадлежащие к родам хлореллы и сценедесмуса, так как большинство их удовлетворяет, хотя и не в полной мере, вышеуказанным важным условиям производства.

Выделение термофильного штамма хлореллы Tx 71105 Сорокиным и Майерсом [62] расширило прежние представления о том, что при температуре свыше 35°C одноклеточные зеленые водоросли не могут расти [28]. В США, Японии [63], Советском Союзе [64] и других странах термофильные штаммы хлореллы и сценедесмуса обнаружены в образцах, взятых из разных почв и естественных водоемов, а также выведены путем искусствен-

ного и постепенного изменения комплекса условий внешней среды.

Благодаря использованию этих штаммов отпадает необходимость охлаждения культур посредством теплообменных аппаратов в установках открытой, а также закрытой систем культивирования (с условием, конечно, чтобы температура раствора не повышалась более 42—43°C). Кроме того, в условиях высокой температуры и интенсивного освещения термофильные штаммы, в отличие от нетермофильных, обладают огромной активностью фотосинтеза. Для штамма хлореллы (*Chl. pyrenoidosa*) Тх 71105 в условиях освещения интенсивностью в 30 киллюкс оптимальная температура культуральной среды была 39°C. При этом темп роста этой водоросли в логарифмической фазе равнялся 5,8 [62]. Известно, что темп роста нетермофильных штаммов превосходит 1,0 в исключительных случаях. В опытах Сорокина и Крауса [95] темп роста того же штамма при 39°C, по сравнению с темпом его же роста при 25°C, как и по сравнению с темпом роста мезофильного штамма хлореллы (*Chl. pyrenoidosa* van Niel), был в три раза больше, и это в тех условиях, когда интенсивность освещения при 39°C также была в три раза больше (табл. 2).

По этой формуле авторы считают, что в логарифмической фазе роста соотношение между плотностью культуры и ее оптической плотностью остается устойчивым. Подсчитанный при помощи этой формулы темп роста выражает число удвоений начальной плотности суспензии в течение одного дня логарифмической фазы.

Приведенные в табл. 2 данные о темпе роста показывают, что из каждой клетки неплотной суспензии термофильной культуры, растущей в условиях высокой температуры (39°C) и интенсивного для данной суспензии освещения (1,5 киллюкс), в течение одного дня логарифмической фазы

Таблица 2

Темп роста термофильного штамма одноклеточных зеленых водорослей (в логарифмической фазе) в разных условиях освещения и температуры по сравнению с темпами роста психрофильных штаммов (по Сорокину и Краусу) [95]

Одноклеточные водоросли	Температура раствора по °С	Интенсивность освещения при насыщении культуры светом (килолюкс)	Темп роста культуры
<i>Chl. pyrenoidosa</i> Tx 71105	39	1,50	9,2
<i>Chl.</i>	25	0,54	3,0
<i>Chl.</i> van Niel	25	0,54	3,1
<i>Chl. vulgaris</i>	25	0,27	2,6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	25	0,54	2,2
<i>Chlamydomonas Reinhardtii</i>	25	0,54	3,8

Примечание: Темп роста авторы подсчитали по формуле

$$K = \frac{1}{t} \log \frac{0 \cdot D_1}{0 \cdot D_0}$$

где t — один день логарифмической фазы, как единицы времени
 $0 \cdot D_1$ — оптическая плотность суспензии в конце периода t ,
 $0 \cdot D_0$ — оптическая плотность суспензии в начале периода.

рифмической фазы роста получены 563 клетки, тогда как из каждой клетки той же термофильной культуры, растущей в условиях температуры 25°C и слабого освещения (0,5 килолюкс), в течение одного и того же дня получено только 8 клеток.

Результаты упомянутых опытов Сорокина и Крауса говорят о том, что термофильные штаммы одноклеточных зеленых водорослей могут развивать огромную фотосинтезирующую активность только тогда, когда высокая температура среды выращивания совмещается с полной световой, а также углеродной насыщенностью.

Об этом свидетельствуют также результаты лабораторных опытов А. А. Ничипоровича и сотрудников [96] по

интенсификации фотосинтетической активности термофильных культур хлореллы (измеряемой при помощи непрерывно регистрирующего инфракрасного газоанализатора количеством поглощенного CO_2 на единицу объема облученной суспензии в зависимости от увеличения ее плотности), а также показатели урожайности, полученные благодаря использованию термофильных штаммов в самый жаркий период лета в некоторых странах, в разных установках открытой системы выращивания (см. табл. 5).

В Голландии Б. Бок и Ж. Ван Орсход [45] выделили очень «гибкий» штамм сценедесмуса, темп роста которого высок в пределах $20^\circ\text{—}45^\circ\text{C}$. Этим авторам удалось в искусственных условиях развести такие штаммы хлореллы, которые хорошо растут при высокой температуре ($39^\circ\text{—}42^\circ\text{C}$).

Опыты Гуммерта и сотрудников (Германия [48, 65]) показали, что одноклеточная зеленая водоросль сценедесмус (*Scen. obliquus*) по сравнению с хлореллой (*Chl. rupeoidosa*) намного устойчива к заражению, а опыты Дж. Майерса в США свидетельствуют о том, что у водорослей хлореллы и сценедесмуса выделение антибиотических и токсических веществ в среде выращивания обычно незаметно [4]. Исследования Моримура (Япония) [66] в установках массового культивирования водорослей под открытым небом приводят к заключению, что клетки различных штаммов одного и того же вида одноклеточных зеленых водорослей образуют на поверхности раствора пену, а также оседают на дне раствора в разной степени. Сравнение специфичности культур одноклеточных зеленых водорослей различных родов в опытах М. Мефферта [67] показывает, что клетки водоросли сценедесмуса (*Scen. obliquus*) оседают на дне раствора быстрее, чем клетки хлореллы (*Chl. vulgaris*), между тем в

опытах Р. Крауса [68] клетки хлореллы (*Chl. pyrenoidosa*) оседали за более короткий промежуток времени, чем клетки сценедесмуса (*Scen. obliquus*).

Для изучения и сравнения особенностей размножения штаммов различных родов и видов одноклеточных зеленых водорослей Б. Бок [45] (Голландия) в естественных условиях выращивал ряд культур в сосудах, расположенных с наклоном в 45° по направлению на юг. Культуры перемешивались потоком воздуха и углекислого газа. Саса [63] и его сотрудники (Япония) подобные опыты ставили в овальных, плоских колбах, почти полностью погруженных в непроточную и неглубокую воду (рис. 11). Изменения температуры культур и особенности их

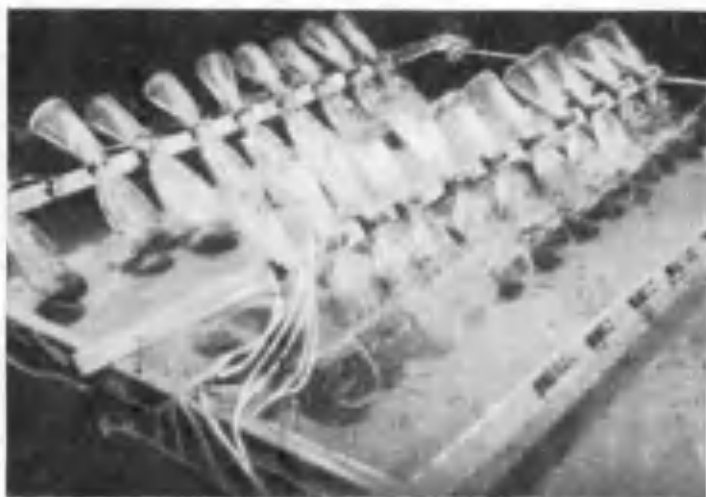


Рис. 11. Культуры, выращенные под открытым небом для изучения сезонного изменения скорости размножения различных штаммов одноклеточных водорослей (Т. Sasa, Y. Morimura, а. И. Tamia, 1955) [63]. Культуральные сосуды, расположенные с наклоном в 45° по направлению на юг, были погружены в непроточную и неглубокую воду, температура которой не регулировалась в течение всего года.

размножения в колбах в разные сезоны года были аналогичны с изменениями температуры и особенностями размножения культур, растущих в бассейнах открытой системы массового выращивания. Для отбора термофильных, мезофильных и холодоустойчивых штаммов с целью массового выращивания их под открытым небом этот последний метод, судя по результатам опытов упомянутых авторов, является удобным и надежным (см. табл. 3).

Таблица 3

Темп роста мезофильных и термофильных культур одноклеточных зеленых водорослей, выращенных под открытым небом в колбах, погруженных в непроточную и неглубокую воду, и эффективность использования ими световой энергии в разные месяцы года

(Т. Саса, И. Моримура, Г. Тамия, 1955) [63]

Месяцы	Хлорелла (<i>Chl. ellipsoidea</i>) (мезофильный штамм)		Хлорелла „С1т 37“ (термофильный штамм)	
	средний темп роста г/м ² в день	эффективность использования световой энергии в %	средний темп роста г/м ² в день	эффективность использования световой энергии в %
Январь	4,4	2,9	0,0	0,0
Февраль	6,3	3,8	0,0	0,0
Март	12,3	6,0	1,0	0,5
Апрель	17,6	8,6	5,1	2,5
Май	17,5	8,0	6,6	3,1
Июнь	15,5	9,6	6,5	4,1
Июль	12,8	6,9	10,3	5,5
Август	7,2	3,2	12,1	5,3
Сентябрь	12,2	6,0	12,5	6,1
Октябрь	16,5	11,9	12,3	8,8
Ноябрь	16,3	12,0	3,8	2,8
Декабрь	6,1	5,2	0,0	0,0

Эффективность использования световой энергии подсчитана на основании видимой солнечной радиации, которая в условиях данных опытов равнялась 44,3% всей солнечной радиации.

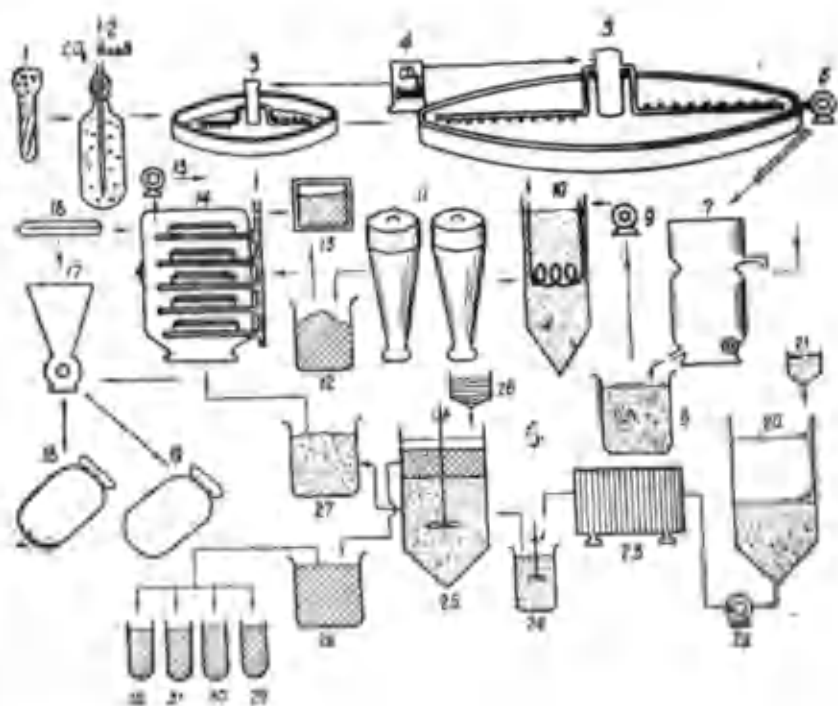


Рис 12. Схема двух технологических процессов обработки биомассы хлореллы на получение зеленого и обесцветенного порошка (Н. Накатага, 1959) [77]. 1—6—Система массового выращивания водорослей: 1—исходная культура водорослей на агаре; 2—первичное размножение в жидкой среде на искусственном свете; 3—размножение в открытом малом бассейне; 4—подача воздуха и CO_2 ; 5—массовое культивирование в больших бассейнах; 6—насос. 7—18—Получение зеленого порошка: 7—центрифугирование суспензии; 8—сырая биомасса; 9—насос; 10—обработка биомассы паром; 11—перетирание; 12—зеленая паста; 13—замораживание хлорелловой пасты; 14—сушка в вакууме; 15—вакуумный насос; 16—сухая биомасса; 17—размол; 18—зеленый порошок. 20—27—Получение обесцветенного порошка (19): 20—бак с суспензией; 21—коагулирующий препарат; добавляется в баке, где происходит осаждение клеток; 22—насос; 23—фильтр-пресс для отжима жидкости; 24—дисперсатор; 25—экстрактор; 26—растворитель; 27—обесцветенная биомасса. 28—32—Получение экстрагируемых продуктов: 28—экстракт; 29—хлорофилл; 30—витамины; 31—жир; 32—остаток.

Приложение 1. Спiсок наиболее употребляемых сред для культивирования протококковых водорослей [131].

Методика выращивания культур под открытым небом, сбор и обработка урожая

Различные методы и мероприятия, применяемые для возделывания водорослей под открытым небом, диктуются установкой той или иной системы культивирования и особенностями каждого штамма в данных условиях. Поэтому мы здесь коснемся тех задач, которые являются общими для всех использованных систем и культур.

Для повышения урожайности культуры, выращенной по какой-либо системе, до высоких показателей необходимо, как было отмечено, плотность суспензии и питательного раствора поддерживать на возможно высоком и устойчивом уровне—в оптимальных для скорости роста культуры пределах. В установках для выращивания культур под открытым небом пока еще не созданы системы автоматического регулирования различных факторов питательной и внешней среды, при помощи которых было бы возможным постоянно поддерживать высокий темп роста культур. Обычно плотность культур и состав питательного раствора поддерживаются в устойчивом состоянии лишь приблизительно, путем периодического сбора определенной части культуры и пополнения раствора новыми элементами взамен исчерпанных питательных веществ.

Для поддержания устойчивости химического состава питательного раствора метод, предложенный Р. Краусом [17,18], рационален и практичен; чтобы усовершенствовать этот метод, необходимо только периодически уточнять химический состав маточного концентрированного раствора для регулирования тех изменений химического состава одноклеточных зеленых водорослей, которые происходят в разные сезоны года вследствие изменения условий их выращивания [28, 69].

Дейвие и сотрудники [29] обосновали следующее положение: урожайность культур повышается, когда раствор продувается воздухом в течение всего дня и ночи, а подача CO_2 необходима только в течение дня. Введение кислорода в раствор необходимо для процесса деления зрелой клетки [25].

Опыты Меферта [67] (Германия) и Эвенари [52] и сотрудников (Израиль) показали, что при получении CO_2 от горения угля необходимо его очистить от SO_2 и HS до внесения в раствор.

Урожайность культуры обусловлена также первоначальной плотностью суспензии и ее уровнем во все время выращивания, который должен быть по возможности высоким и устойчивым.

При начале массового выращивания водорослей в летние месяцы следует использовать больше посевного материала, чем в холодную погоду, так как этиолирование (bleaching) клеток, вследствие разрушения хлорофиллозного аппарата, случается часто, когда температура низкая, а интенсивность света очень большая [29, 31]. С другой стороны, плотность культур необходимо поддерживать в летние месяцы на более высоком уровне, чем в течение зимы, чтобы энергия солнечного света, которой значительно больше в теплом сезоне, использовалась в наибольшей мере. При всех условиях культуры не должны быть очень плотными, так как в этом случае не все клетки насыщаются светом, следовательно, наряду с ослаблением фотосинтеза и темпа роста, культуры постепенно становятся нежизнеспособными. В многочисленных опытах массового культивирования водорослей наибольшая плотность культуры, которая нам известна из литературы, получена в опытах Майерса [49] 55 г/л — вес сухой биомассы за 22 дня, т. е. 2,45 г/л в день. Вес

100 млрд. клеток хлореллы в сухом виде равняется примерно 1 г.

Итак, Майерс довел плотность культуры до 5,5 млрд. клеток в миллилитре, выращивая хлореллу (*Chl. rupeoidosa*) в стеклянном сосуде с двойными стенками; внешний диаметр внутренней стены сосуда равнялся 32 мм, внутренний диаметр внешней стены—45 мм. Освещенная поверхность суспензии по сравнению с ее объемом была в 1800 раз больше. В одном из сравнительных опытов, проведенных в сосудах с различными диаметрами (см. табл. 4), темп роста этой культуры равнялся 3 г/м² в

Таблица 4*

Культуральный сосуд	Темп роста г/л в день	Поверх- ность см ² /л	Темп роста г/м ² в день
Стеклянная трубка диаметром 30 см	0,035	200	1,8
Стеклянная трубка диаметром 5 см	0,081	850	0,95
Стеклянная трубка диаметром 2,5 см	0,19	1600	1,2
Трубка с двойными стенками с внешним диаметром внутренней стенки 3,2 см и пространством между стенками 0,6 см	0,54	1800	3,0

* Таблица дана по Майерсу [49].

день в пересчете на единицу освещенной поверхности, или 0,54 г/л в день в пересчете на объемную единицу суспензии. Как видно из таблицы, темп роста культур обусловлен главным образом величиной их освещенной поверхности по сравнению с объемом.

Конечно, такие плотные культуры невозможно выращивать в открытых бассейнах массового размножения водорослей, где глубина суспензий обычно колеблется между 10—20 см, а иногда и больше [58]. В Японии в

бассейнах выращивания одноклеточных водорослей плотность культур обычно поддерживается в пределах 1—2 г/л зимой (приблизительно 100—200 млн. клеток/мл) и 2—4 г/л в летние месяцы; при посеве первоначальная плотность суспензий бывает: зимой—100 мг/л (10 млн. клеток/мл), а летом—20 мг/л.

Выращенные под открытым небом культуры заражаются различными микроорганизмами, которые могут причинить серьезные убытки, если не применяются соответствующие меры для предотвращения их размножения.

Для сохранения культур в обезвреженном состоянии существенной разницы между открытой и закрытой системами выращивания нет, так как в обоих случаях они могут заразиться в одинаковых размерах, как это выяснено опытами, проведенными обществом А. Д. Литл [70].

Из вредной микрофауны и микрофлоры отметим протозоя (*Yorticella*, *Amoeba*, *Chilodonella*, *Paramecium*), коловратки (*rotiferae*) *Dilorella tigris*, бактерии (*Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Aureobacter*, *Cauleobacter*, *Klapsiella*, *Flavobacterium*, etc...), грибы (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*) и сине-зеленые водоросли, о которых имеются подробные описания в соответствующей литературе [29, 48, 55, 59, 61, 71, 72].

Из них протозоя и коловратки, для которых лето является временем самой активной деятельности, наносят культурам наибольший вред.

Бывали случаи, когда они в течение одного-двух дней уничтожали целую культуру [48, 55].

Для предохранения растущих культур водорослей от микробного заражения применяют различные антибиотики, из которых наиболее эффективны 2,4-динитро-6-циклогексил, фенилацетат и пентахлорфенил [55] (1—3 мг/л, CaCl [73] 2—4 мг/л), гексахлоран, колимицин, тетра-

циклин, левомецетин. Выбор и дозы последних антибиотиков определяют с учетом состава среды и штаммов, использованных для массового выращивания водорослей. При использовании их соответствующими дозами эти вещества не влияют отрицательно на активность роста культур [74].

Основным средством обезвреживания культур является создание оптимальных условий для их роста, при этом на весь период выращивания необходимо поддерживать плотность культур и каждый сбор урожая проводить в пределах линейной фазы роста, оптимальных для скорости размножения водорослей.

Некоторые авторы [73, 81] рекомендуют очищенный от водорослей раствор, после нескольких сборов биомассы, больше не использовать для их выращивания. Таким образом, предотвращается накопление в среде выращивания органических веществ, образующихся в результате жизнедеятельности водорослей, стало быть, и размножение вредных микроорганизмов.

В процессе роста культур на поверхности растворов часто образуется пена, особенно когда они уплотняются. Это обстоятельство отрицательно влияет на урожайность культур, так как при прохождении через слой пены интенсивность света снижается на 25—30% [6]. Испытание предложенных разными авторами противопенных веществ (растворенный в жире октадеканол, силикон ДС—200 по одной капле на каждый литр суспензии) [10, 75] в бассейнах выращивания одноклеточных водорослей показало, что действие этих веществ длится только один день. Самым лучшим способом предотвращения пены является выбор таких штаммов хлореллы и сценедесмуса, которые при массовом выращивании на поверхности раствора образуют немного пены.

Культивирование одноклеточных зеленых водорослей

связано также с рядом технических задач, которые еще не нашли своего окончательного решения.

При периодическом сборе урожая отделение биомассы из жидкой среды проводится механическим или химическим способами.

Метод отделения водорослей из раствора при помощи центрифуги, будучи эффективным, при всех случаях является дорогостоящим, как показали изучения, проведенные в США, Японии и Израиле [1, 55, 58].

Различные химические способы искусственного осаждения (седиментация) водорослей подробно изучены в Китае и Японии [76, 77].

В Китае [10] Мин Ци-юань изучил действие кислот, щелочей, извести и насыщенного известью водного раствора на достаточно плотные суспензии одноклеточных водорослей (300 млн. клеток/мл) [76].

HCl в пределах 5—40 мг/л осаждает водоросли через 30 часов после ее смешивания с суспензией; осажденные на дне раствора водоросли бывают этнополированными.

NaCl в пределах 0,5—10 г/л осаждает водоросли также через 30 часов.

При использовании CaOH и NaOH в пределах плотности: первый 200—500 мг/л, второй—100—300 мг/л, процесс осаждения протекает очень медленно.

Алюминиевые квасцы применялись в пределах 100—500 мг/л. Дозами до 300 мг/л всю массу водорослей осаждают приблизительно через 4 часа, а дозами с 300—500 мг/л—примерно через 1 час 5 мин., значит, влияние HCl и NaCl по сравнению с сернокислым алюминием слабее. Однако, по автору, раствор, очищенный от водорослей сернокислым алюминием, нельзя вторично использовать для выращивания водорослей.

При добавлении в суспензию насыщенного известью водного раствора Ca(OH)₂ (в соотношении 60 мл/л)

вся масса водорослей накапливается на дне сосуда примерно через 2 часа; очищенный от водорослей раствор можно вторично использовать для выращивания культуры, его рН не превышает 9.

При применении гашеной или негашеной извести в нерастворенном виде водоросли не осаждаются. Отсюда вытекает, что искусственное осаждение водорослей обусловлено совместным влиянием ионов Са и ОН на жидкую среду и на клетки, а не увеличением концентрации кальция.

Кальций вызывает уплотнение оболочки клеток и изменение их проницаемости, вследствие чего меняется их удельный вес. Ион ОН также влияет на оболочку клетки и вызывает гидролиз находящихся в среде выращивания коллоидных веществ. В своем заключении автор сообщает, что данный метод осаждения водорослей для сбора урожая, по сравнению с другими методами, более эффективный и дешевый.

Быстрота процесса искусственного осаждения водорослей обусловлена также внешними факторами (температура, интенсивность освещения и форма сосуда, используемого для осаждения).

Опыты того же автора показали, что процесс осаждения ускоряется с повышением температуры (сравнительные опыты проводились при 20°C и 30—40°C). Усиление интенсивности освещения приводит к обратному результату (скорость осаждения изучалась в темноте, а также в условиях искусственного и естественного освещения). По мнению автора, это явление объясняется изменением продуктов обмена веществ, связанного с изменением интенсивности освещения.

Скорость осаждения водорослей изучалась также в сосудах различной формы: цилиндрические (с узким или широким диаметром), конусообразные, круглые и т. д.

Наиболее быстрое осаждение водорослей имело место в конусообразных сосудах (через 15 минут после наполнения, 72% биомассы).

В процессе искусственного осаждения водорослей возраст культуры имеет большое значение. Клетки различных возрастов несут на своей оболочке коллоидные вещества с различной толщиной слоя. При делении зрелых клеток эти вещества отделяются от них и постепенно растворяются в среде выращивания. Следовательно, чем старше культура, тем больше этих веществ накапливается в растворе. Кроме того, одновременно с ростом культуры растет и количество выделяемых клетками органических веществ в растворе, так что, если культура выращивалась в бассейне сравнительно долго и если плотность ее большая (более 300 млн. клеток/мл), то для осаждения водорослей необходимо в суспензию добавить водный раствор извести или разбавить ее чистой водой.

Для осаждения одноклеточных зеленых водорослей в Японии применяют хлорид титана $TiCl_4$ в концентрации 0,01%. По сравнению с вышеупомянутыми химикатами последний, по данным авторов [77], более действенный, так как при его применении водоросли немедленно оседают большими хлопьями.

После декантации очищенной от водорослей жидкости осушение осажденной на дне сосуда биомассы проводится пресс-фильтром, а затем на солнце или в аппаратах искусственной сушки (биомассу ставят в ток горячего воздуха или сушат в вакууме при температуре 100—200°C). Другими методами сушки сырой биомассы водорослей являются:

а. Лиофильная сушка биомассы в вакуумной камере при температуре ниже 0, которая в зависимости от мощности аппарата длится 24—28 часов. Сушка, проводимая этим способом, обходится очень дорого. Помимо

этого, при лиофильной сушке оболочки клеток разрываются, что приводит к превращению сухой биомассы в гигроскопическую, которую трудно хранить. Опыты Дж. Комбса [78] по кормлению цыплят показали, что при добавлении такой биомассы к рациону птиц последние глотают корм с большим трудом.

б. Метод спиртовой сушки сырой биомассы водорослей [77], по которому она ставится в экстрактор, содержащий метанол, и определенное время держится при температуре 60°C, пока зеленые пигменты экстрагируются и извлекаются те вещества, запах которых специфичен для водорослей.

В конце, для очистки биомассы от соли титана, на сухую массу водорослей наливают слабый раствор соляной кислоты и перемешивают. $TiCl_4$ полностью растворяется в соляной кислоте.

Урожайность культур, выращенных под открытым небом

По данным, подытоженным в сборнике «Культивирование водорослей от лаборатории до полупроизводственных установок» [1] Института Карнеги в 1953 году, максимальным показателем урожайности хлореллы в условиях естественного освещения было 17 г/м² в день.

В этих опытах Дейвиса и сотрудников [34] культура росла в стеклянном сосуде, имеющем небольшой наклон, в ноябре, когда дневная продолжительность солнечного освещения равнялась 8—9 часам. Температура питательного раствора регулировалась днем при 30° и вечером при 20°C. Исходя из вышеуказанной урожайности, авторы сделали вывод, что в июне и июле, когда продолжительность естественного дневного света составляет 12—15 часов, среднюю урожайность хлореллы возможно довести до 30 г/м² в день. Однако данные, приведенные в вы-

шеуказанном сборнике и полученные в опытах выращивания хлореллы в большом масштабе, показывают, что средняя дневная урожайность колеблется в пределах 9—11 г/м² в период ее быстрейшего размножения (30/VII—9/IX) [70].

Благодаря усовершенствованию техники массового культивирования, а также использованию наиболее активных форм одноклеточных зеленых водорослей, полученных путем отбора и разведения, за последние годы повысилась урожайность культур, выращиваемых под открытым небом.

В Японии, Израиле, Китае урожайность культур, выращенных в открытых бассейнах в самые благоприятные времена года (весной, летом или осенью), дошла до 28—34 г/м² в день (см. табл. 5).

О достижениях в этой области в 1953—1960 годах определенное представление можно составить по данным, приведенным в табл. 5.

Таблица 5
Средняя и максимальная урожайность культур, выращенных разными методами под открытым небом в наиболее благоприятные месяцы года

Метод культивирования	Водоросли	Месяц	Средняя и максимальная урожайность в г/м ² в день	Год и литературный источник	Примечание
1	2	3	4	5	6
1. Культура, перемешанная механической силой в цементных чашах	Хлорелла штамм А	V—X	7,2	1951	Глубина культуры—30 см, объем—300 л, освещенная поверхность—1 м
		VIII—X	4,9	(27)	

1	2	3	4	5	6
2. Культура, перемешанная насосной закрытой циркуляцией и полимерных прозрачных плоских кольцеобразных трубках	Хлорелла	VII—IX	9 (11)	1951 (70)	Длина трубы—50 м, ширина—1,2 м, глубина культуры—5—10 см. Объем—4500 л, освещенная поверхность—60 м ² . Скорость циркуляции раствора—10 см/сек. Регулирование температуры летом посредством тонкой струи бытовой воды
3. Культура, перемешанная продуванием воздуха в цементных корытах	Сценелес-мус	VII	5,7	1952	Размеры корыта: 9×0,7×0,24. Внутренняя поверхность покрыта синтетической пленкой. Толщина культуры 9—15 см, объем—600 л. Подача воздуха: 1 л (1 л раствора) 1 мин. Подача CO ₂ : 1% количества воздуха
	<i>Sc. obliquus</i>	VIII	6,6	(48)	
4. Культура, перемешанная механической силой в цементных чанах	Хлорелла штамм А	V	10 (12)	1952 (79)	Координаты подобны координатам первого пункта
		VI	11 (13)		
		VIII	8/9		
5. Культура, перемешанная посредством продувания воздуха в открытых неглубоких траншеях	Хлорелла штамм Sp6	V VI	13 (20) 17 (28)	1954 1955 (66)	Объем культуры 200—500, освещенная поверхность 2,5—5,5 м ² . Подача воздуха, обогащенного CO ₂ , 0,25—0,5 л (1 л раст.) 1 мин.
	Штамм „Стп 37“ термофильный	VIII	16 (21)		
	Сценелесмус штамм „Стп 5“ термофильный	IX	12 (16)		

1	2	3	4	5	6
6. Культура, перемешанная посредством насосной циркуляции в открытых неглубоких круглых или прямоугольных бассейнах	Хлорелла штамм „Стп 5“ термофильная	VII VIII	19 (24) 15 (19)	1955 (55)	Глубина бассейна 20 см, диаметр круглого бассейна 5—10 м, объем культуры 2000 л. Насыщение раствора воздухом и CO ₂ проводится посредством насосной циркуляции
7. Культура, перемешанная лопастями или пропеллерами в глубоких бассейнах	Хлорелла Chl. vulgaris	IV V	19 21 (30)	1956 (58)	Глубина культуры 91 см. Размеры бассейна 2×1×1 м; южная стена прозрачная, другие стены окрашены в белый цвет. Перемешивание проводилось ежедневно по 10—14 часов. Подача CO ₂ (в чистом виде) ежедневно 300 л в течение одного часа
	Хлорелла Chl. pyrenoidosa штамм ТХ71105	VI	20 (32)		
8. По способу, указанному в пункте (6), к которому прибавляется солнечная батарея, составленная из стеклянных двухстенных трубок	Хлорелла Chl. pyrenoidosa термофильная	VIII— IX	21 (34)	1959 1960 (73)	Диаметр круглого бассейна 1,5 м. Глубина культуры 20—25 см, объем 300—350 л. Перекачанная посредством насоса из бассейна в солнечную батарею суспензия попутно насыщается CO ₂ в отдельном сосуде. Температура раствора регулировалась летом посредством камышовых настилов, зимой — пластмассовыми крышками.

Как отмечено в таблице, эти данные относятся к урожайности культур, выращенных под открытым небом в бассейнах, занимающих сравнительно небольшие площади. Они получены в наиболее благоприятном для размножения водорослей определенном периоде сезона. Вне этого периода и в другие сезоны года урожайность культур обычно значительно меньше, а в определенных случаях—в зимние холодные или летние жаркие дни она крайне низкая, вплоть до нуля, если не используются соответствующие штаммы.

Урожайность культуры водорослей находится в большой зависимости от размеров установок для их выращивания. В небольших бассейнах несомненно легче получить высокие средние и максимальные выходы биомассы, так как в них проще создать оптимальные условия для выращивания культуры, чем в больших бассейнах. Урожайность культур, выращенных в одних и тех же условиях одним и тем же способом, как правило, значительно снижается в установках того же типа, но больших размеров. В качестве примера можно привести данные, полученные Каназавой [82] и Накамурой [47, 83] (Японский институт микроводорослей), об урожайности культур, выращенных в бассейнах, резко отличающихся по размерам, но в тех же естественноклиматических условиях и тем же методом (см. табл. 6).

Среднедневная урожайность культур поверхностью $19,6—78,5 \text{ м}^2$ в наиболее благоприятное время года (апрель—ноябрь) была $12,5 \text{ г/м}^2$ (вес сухой биомассы), тогда как урожайность культур поверхностью 4000 м^2 , выращенных в производственных условиях, за тот же период составила $2,5 \text{ г/м}^2$ в день.

Как видно, урожайность культур, выращенных в производственных масштабах, очень низка и никак не сравнима с показателями урожайности, которые полу-

Т а б л и ц а 6

Урожайность культур, выращенных в Японии одинаковым способом, но в бассейнах разных размеров
(в г/м² день)

Автор	Год	Размеры установок в м ²	Объем культур в литрах	Январь	Февраль	Март	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь	Ноябрь	Декабрь	Средний урожай за апрель—октябрь
Капазана	1958	19,6—78,5	1960—3550	1,6	2,2	5,5	11,5	18,5	14,0	9,1	13,4	12,3	9,0	5,0	2,0	12,5
Накамура	1959	4000	185000	—	—	—	—	2,2	2,0	1,9	4,0	3,0	2,8	1,5	1,5	2,5
Накамура	1960	4000	185000	1,0	0,7	0,6	2,0	2,2	2,9	3,6	2,0	2,1	2,8	1,6	0,5	2,5

чены в установках небольших размеров от культур, выращенных в оптимальный для их роста кратковременный период (табл. 5). Возле Токио, в открытых бассейнах, где массовое выращивание водорослей проводится круглогодично с сезонным использованием термофильных, мезофильных и холодоустойчивых штаммов сценедесмуса и хлореллы, оптимальные температуры для размножения которых соответственно 40, 25 и 15°C, урожайность культур, выращенных в производственных условиях в разные месяцы 1959 и 1960 годов, была следующая (см. табл. 7) [47].

Таблица 7

Месяцы 1959 г.	Вес сухой массы, кг/га в месяц	Месяцы 1960 г.	Вес сухой массы, кг/га в месяц
		Январь	325,0
		Февраль	187,5
		Март	175,5
		Апрель	612,5
Май	650,0	Май	687,5
Июнь	612,5	Июнь	875,5
Июль	600,0	Июль	1125,0
Август	1250,0	Август	612,5
Сентябрь	937,5	Сентябрь	625,0
Октябрь	875,0	Октябрь	875,0
Ноябрь	450,0	Ноябрь	462,5
Декабрь	462,5	Декабрь	150,0
		Всего за год	6713,0 кг/га

В 1960 году общая урожайность культур была 67,13 ц/га, из них 58,7 ц получены в наиболее благоприятные месяцы (апрель—ноябрь). Если даже считать, что белки составили 50% сухой биомассы, то в 1960 году в Японии с 1 га водной площади при выращивании однокле-

точных зеленых водорослей получено приблизительно 3350 кг белков.

Среднемесячная урожайность одноклеточных зеленых водорослей (*Chlorella pirenoidosa*, *Scenedesmus obliquus*, *Scen. quadricauda*), выращенных в девяти установках горизонтального типа сотрудниками Научно-исследовательского биологического института Ленинградского университета в разные месяцы 1962 года, по данным авторов (В. Пиневиц, Н. Верзилин) [81], была следующая (см. табл. 8).

Таблица 8

Месяцы	Вес сухой массы	Месяцы	Вес сухой массы
Май	142,6 г/м ²	Ноябрь	78,0 г/м ²
Июнь	249,0 .	Декабрь	—
Июль	284,5 .	Январь	—
Август	282,1 .	Февраль	72,0 .
Сентябрь	156,0 .	Март	65,1 .
Октябрь	133,3 .	Апрель	90,0 .

Следовательно, в 1962 году с каждого квадратного метра получено всего 1553,4 г сухой массы водорослей, из них 1337 г и апреле—октябре. Само собой разумеется, что эти данные об урожайности, полученные с культур, занимавших площадь всего 124 м², нельзя механически целиком и полностью перевести на гектар. Как в Японии и других странах, так и в условиях Ленинграда при выращивании водорослей на больших площадях в производственном масштабе данные урожайности, несомненно, понизятся. Следовательно, при пересчете вышеуказанных данных на ц/га необходимо иметь в виду, что по сравнению с культурами, выращенными в опытных бассейнах, урожайность снижается не менее чем на 50%, а то и на 80%, как это имело место у культур, выращенных в Японии (Каназава, Накамура) [82, 83]. Поэтому

максимум годовой урожайности культур, выращенных в Ленинграде по способу, описанному авторами [81], можно принять 77 ц/га (сухого вещества). Как в отношении культур, выращенных в Японии, так и в данном случае, если примем, что белки составили 40—50% сухого вещества водорослей, получится, что в Ленинграде с культур, плавших 1 га водной поверхности (т. е. занимавших $\frac{1}{3}$ гектара земельной площади), в 1962 году получено около 3400 кг белков, т. е. почти столько, сколько получено в Японии в 1960 году с культур, выращенных в производственных условиях. В связи с этим авторы пишут: «Очевидно, даже существенные различия в конструкции установок, в том числе в способе перемешивания суспензии и режима подачи углекислоты, мало сказываются на средних приростах сухого вещества водорослей» [81]. Затем: «По существу, никто из исследователей не сумел добиться непрерывного культивирования одноклеточных водорослей в течение даже благоприятного времени года. Обычно по тем или иным причинам часть установок не работает. В результате, даже при хороших средних приростах, общий урожай со всей площади установок за вегетационный период значительно уступает запланированному (так, например, Накамура при плановом ежегодном урожае в 1 т на акр фактически получил всего 210 кг). Сильно различаются среднесуточные приросты между отдельными, одновременно работающими бассейнами. Причины таких различий далеко не всегда ясны... Наконец, никому не удалось добиться и равномерных средних приростов за более или менее длительное время. Хорошие выходы по неизвестной причине сменяются низкими и наоборот. Хотя природа таких колебаний не установлена и, возможно, лежит в каких-то внутренних закономерностях развития культуры водорослей, очевидно, их можно избежать».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что в сельскохозяйственной практике, в условиях правильного применения агротехнических мероприятий, из кормовых культур урожайность люцерны с 1 га доходит до 150 ц, а иногда даже 200 ц. Содержа-ние белка в люцерне в начале цветения составляет в среднем 18%, следовательно, с каждого гектара люцер-ны можно получить до 2700—3600 кг белков. Несомнен-но, содержание белков и витаминов в одноклеточных зе-леных водорослях как по качеству, так и по количеству богаче люцерны, а также других кормовых культур (см. табл. 9, 10, 11).

Таблица 9
Аминокислотный состав сухой биомассы хлореллы
(Дж. Комбс) [84]

Питательное вещество	В лабора- торном об- разце, в %	Питательное вещество	В лабора- торном об- разце, в %
Сырой протеин	40,00	Лизин	2,43
Аргинин	2,39	Метионин	0,57
Гистидин	0,65	Фенилаланин	2,14
Изолейцин	1,69	Треонин	1,91
Лейцин	1,99	Валин	2,67
Триптофан	0,41	Глицин	2,20

Кроме вышеуказанных витаминов, сырая биомасса хлореллы содержит витамин С—60 мг в 100 г.

Из выявленных до сих пор в белках водорослей 23 аминокислот только аспарагин и глутамин содержатся в довольно недостаточном количестве [47, 97]. Для сбалансированного кормления млекопитающих из незаменимых десяти аминокислот метионин, гистидин и триптофан содержатся в недостаточном количестве [85], однако опыты по кормлению животных, проведенные рядом авторов, показывают, что к их рационам следует прибавить только дозы метионина и лизина [84, 98].

Таблица 10
Состав незаменимых аминокислот в переработанных разными способами образцах хлореллы (Аями, Мацуно, Шино) [85]

Аминокислоты	На 100 г белка (в граммах)		
	высушенный лиофильным способом	депигменти- рованный	перерабо- танный ме- танолом
Изолейцин	2,88	3,43	3,42
Лейцин	6,85	8,52	8,81
Лизин	5,55	5,92	6,65
Фенилаланин	4,08	4,60	4,91
Метионин	1,23	1,51	1,62
Треонин	3,88	4,38	4,76
Валин	4,97	5,26	5,09
Гистидин	1,24	1,39	1,72
Аргинин	5,51	6,47	6,33
Триптофан	1,23	1,54	1,60
N (%)	12,34	9,67	10,68
Белок (%)	77,13	60,44	66,75

Тем не менее, низкая урожайность культур, выращиваемых под открытым небом с целью кормодобывания, как видим, пока еще совершенно не оправдывает расходов на мероприятия по их выращиванию.

По данным Р. Крауса [47], в Японии (1962) себестоимость одного килограмма обесцвеченного (депигментированного) сухого порошка водорослей (рис. 12), выра-

ценных и открытых бассейнах (площадью 0,4 га) в производственном масштабе, составила 4 доллара, которая очень высока по сравнению с ценами, предусмотренными подсчетами Тамия [55] и А. У. Фишера [54] в 1953—1954 годах, соответственно 0,58 и 0,40—0,55 доллара.

Таблица 11
Содержание витаминов в сухой биомассе хлореллы
(Дж. Комбе) [84]

Витамины	Лабораторный образец (100 г)	Витамины	Лабораторный образец (100 г)
Пантотеновая кислота	2,0 мг	Пиацин	25,0 мг
Каротин (А, провитамин А)	48,0 .	Пиридоксин (В ₆)	2,30 .
Витамин К	0,6 .	Холин	302,0 .
Тиамин В ₁	1,0 .	Биотин	0,015 .
Рибофлавин (В ₂)	3,5 .	Витамин В ₁₂	0,002 .

По данным Накамуры [77], 40% себестоимости составляют: расходы по содержанию обслуживающего различные оборудования персонала; 20% — расходы на горючее (керосин) для получения углекислого газа; 17% — стоимость растворителей (ацетон или этанол), используемых для очистки отцентрифугированной биомассы водорослей от зеленых пигментов, а остальную часть — 23%, составляют расходы на необходимые материально-технические средства для выращивания водорослей (удобрения, химикаты, электроэнергия, марля для пресс-фильтра и т. д.).

В своем докладе указанный автор пришел к выводу, что для снижения себестоимости сухого порошка водорослей необходимо:

- а) сократить обслуживающий персонал путем усо-

вершенствования методов выращивания культур и используемого для этого оборудования;

б) для получения углекислого газа использовать дешевое сырье;

в) зеленую биомассу использовать без обесцвечивания.

В 1954 году Тамия предполагал, что в дальнейшем в оборудованных бассейнах, занимающих 40 га земельной площади, годовая урожайность культур достигнет 400 ц/га или 12,5 г/м² в день (сухой биомассы), а Фишер для культур, циркулируемых в прозрачных полимерных трубках посредством насосов, предполагал годовую урожайность 870—1230 ц/га, или 25—35 г/м² в день. Однако в 1960 году в Японии, близ Токио, фактическая урожайность культур, выращенных на площади 0,4 га, составила 67 ц/га, что в 7 раз ниже предположительного показателя, принятого Тамией в подсчетах 1954 года. Поэтому и себестоимость сырья обошлась в 7 раз выше цены, предусмотренной им (4,00 доллара вместо 0,58 доллара). Для сравнения можем отметить, что в 1959 году в Японии цены на люцерну (сухую), сою и рыбу были соответственно 0,07, 0,14 и 0,3 доллара за килограмм [77].

Результаты опытов кормления животных (кроликов), проведенных в Японии (Тамия, 1961) [47], показывают, что питательная ценность белка сухой биомассы хлореллы по сравнению с белком сои в 2 раза выше. Учитывая, что сухая биомасса хлореллы содержит в 2—2,5 раза больше белка, чем соя, можно сказать, что 1 кг этого сырья по своей питательности равноценен 4—5 кг сои. Однако его себестоимость в Японии в 1960 году была в 6—7 раз выше стоимости эквивалентного (по питательности) количества (4—5 кг) сои.

В США опыты по выращиванию водорослей под открытым небом в полупроизводственном масштабе, опи-

санные в монографии Института Карнеги, были прекращены в 1951 году из-за низкой урожайности культур: 5—6 г/м² день, считая для основного периода опыта (июль—20 октября), и 7—11 г/м² день в наиболее благоприятный период для выращивания водорослей (июль—сентябрь). Эти показатели урожайности довольно убедительно свидетельствовали о том, что при одном и том же методе культивирования [70] (см. стр. 23 и 42) урожайность водорослей, следовательно и себестоимость полученного сырья, невозможно довести до показателей и себестоимости, предусмотренных в подсчетах Фишера.

Низкий уровень производительности водорослевых культур, выращенных под открытым небом, отчасти объясняется рядом недостатков производственной техники; в самом лучшем случае используется только третья часть продуваемого СО₂, подаваемого искусственным способом, а остальная часть теряется. Интенсивность перемешивания суспензий недостаточная, а различные способы сбора урожая малоэффективны.

Однако основная причина низкой урожайности культур заключается в том, что они состоят из разновозрастных клеток, которые находятся в различных фазах роста и развития и обладают совершенно различными свойствами. Следовательно, комплекс условий культуральной среды может быть, с одной стороны, благоприятным для жизнедеятельности клеток, находящихся в определенной фазе цикла роста и развития, в то же время может и препятствовать росту или быть неблагоприятным для клеток, находящихся в других фазах роста или развития.

Таким образом, максимальный темп роста культур возможен только тогда, когда находящиеся в суспензии все, или почти все, клетки бывают одинакового возраста, а рост и развитие их протекает одинаковым темпом.

Лабораторными опытами Сорокин и Краус [99] изу-

чили скорость роста хлореллы в условиях непрерывного, синхронного, а также несинхронного культивирования, т. е. в условиях непрерывного освещения и при перемежающихся периодах света (8—9 часов) и темноты (2—4 часа). Было показано, что в неизменяемых условиях интенсивности освещения (приблизительно 11 тыс. люкс), температуры и питания за 8 часов экспоненциального роста в условиях непрерывного освещения объема клеток (число удвоений объема) термофильной культуры (*Chlorella pyrenoidosa* Tx 71105, выращенная при 39°C) возрастал в 3,3 раза по сравнению с объемом мезофильной культуры (*Chlorella pyrenoidosa* штамм Эмерсон, выращенный при 25°C), тогда как при перемежающихся периодах света и темноты этот объем увеличивался в 5,3 раза. Это значит, что удвоение объема клеток в световом периоде происходило за 1,5 часа у термофильной синхронной культуры—против 2,5 и 8 часов соответственно для термофильной и низкотемпературной несинхронных культур. Если учесть, что при вышеуказанных периодах освещения и темноты клетки синхронной культуры проходили 2,5 цикла развития за сутки, то получится, что клеточная масса в данном случае увеличивалась за сутки приблизительно в 8200 раз (рассчитано по формуле $l = aq^{n-1}$, где l —клеточная масса в конце суток, a —клеточная масса в начале суток, q —удвоение объема клеток, n —число удвоения в сутки, т. е. $2,5 \times 5,3 = 13,25$) против 1000 раз и 8 раз соответственно для термофильной и мезофильной несинхронных культур.

Эти опыты показали, что при максимальных условиях культивирования продуктивность синхронной термофильной культуры хлореллы может более чем в 1000 раз превышать продуктивность несинхронной мезофильной культуры. Следует отметить, что использование при указанных опытах интенсивность и спектральный состав света, в особенности определенные длины волн белого

света, авторы считают не только не оптимальными, а даже неблагоприятными для жизнедеятельности клеток, тем более в стадии их созревания и воспроизведения.

Из вышеизложенного вытекает, что для разрешения задачи рационального культивирования одноклеточных зеленых водорослей следует и дальше продолжать изучение синхронных культур, методика которого совершенно отличается от методик, примененных до сих пор при выращивании культур под открытым небом.

Только закономерности, выявленные путем исследований на уровне одной клетки, могут служить основанием для массового выращивания водорослей в производственных условиях, в замкнутых системах, регулируемых по разным фазам жизненного цикла в отношении всех факторов, обуславливающих интенсивный рост культур, с устранением недостатков открытых, а также закрытых систем, применяемых до настоящего времени.

Знание этих закономерностей позволит эффективно использовать круглый год, независимо от погоды, световую энергию, углекислый газ, питательные вещества, наиболее активные формы одноклеточных водорослей, а также экономически обосновать расходы, затрачиваемые на выращивание культуры одноклеточных зеленых водорослей.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Carnegie Inst. Washington Publication № 600, 1953.
2. Proceedings of the World Symposium on Applied Solar Energy, Stanford Research Institute, Menlo Park, Calif., 1956.
3. Всесоюзное совещание по культивированию одноклеточных водорослей (Тезисы докладов). Л., 1961.
4. Myers J. Annual Review of Microbiology, 1951.
5. Moyses A. Année biologique, 3e Série, t. 32, fasc. 3—4, 1956.
6. Тамия Н. Annual Review of Plant Physiology, 1957.
7. Krauss R. W. Annual Review of Plant Physiology, 1958.
8. Physiology and Biochemistry of Algae, Academic Press, Inc. R. A. Lewin, editor, New York 3, 1962.
9. Nielsen E. S. Physiol. Plantarum, 8, 317—35, 1955.
10. Geoghegan M. J. Carnegie Inst. Wash. Publ. № 600, 182—89, 1953.
11. Osterlind S. Physiol. Plantarum, 3, 403—408, 1952.
12. Ketchum B. H. Ann. Review Plant Physiol. 5, 55—74, 1954.
13. Pirson A. Ann. Review Plant Physiol., 6, 71—114, 1955.
14. Provasoli L. and Pitner I. J. Ann. N. Y. Acad. Sci., 56, 839—51, 1953.
15. Myers J. Plant Physiol., 22, 590—97, 1947.
16. Тамия Н., Hase E. et al. Carnegie Inst. Wash. Publ. № 600, 204—32, 1953.
17. Krauss R. W. Plant Physiol., V. 29, 205—14, 1954.
18. Krauss R. W. Science Monthly, 80, 21—8, 1955.
19. Cook P. M. Indust. Eng. Chem. 43, 2385—89, 1951.
20. Myers J. and Clark L. B. J. Gen. Physiol., 28, 103—12, 1944.
21. Phillips J. N. Jr. and Myers J. Plant Physiol., 29, 3, 148—52, 1954.

22. Gotaas H. B. and Oswald W. J. et al. *Science Monthly*, 79, 368—78, 1954.
23. Oswald W. J., Gotaas H. B. et al. *Sew. and Ind. Wastes*, 25, 692—705, 1953.
24. Myers J. *Carneg. Inst. Wash. Publ. № 600*, 37—54, 1953.
25. Tamiya H., Iwamura T. et al. *Biochim. et Biophys. Acta*, 12, 23—40, 1953.
26. Kratz W. and Myers J. *Am. J. Bot.*, 42, 282—87, 1955.
27. Wassink E. C., Kok B. and Oorschot J. van. *Carneg. Inst. Wash. Publ. № 600*, 55—62, 1953.
28. Aach H. G. *Arch. Mikrobiol.*, 17, 213—46, 1952.
29. Davis E. A., Dedrick J., French C. S. et al. *Carnegie Inst. Wash. Publ. № 600*, 105—53, 1953.
30. Kok B. *Acta Botan. Neerl.* 1, 445—67, 1952.
31. Tamiya H., Sasa T. et al. *J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo)* 1, 298—307, 1955.
32. Phillips J. N. and Myers J. *Plant Physiol.*, 29, 3, 152—61, 1954.
33. Пиневич В. и др. *Вестник Ленинградского унив.* 1961, 9.
34. Lilly V. G. and Leontan L. H. *Am. J. Bot.*, 28, 569—72, 1941.
35. Tamiya H., Shibata K. et al. *Carneg. Inst. Wash. Publ. № 600*, 76—84, 1953.
36. Nihel T., Sasa T., et al. *Arch. Mikrobiol.* 21, 4, 2, 155—64, 1954.
37. Emerson R., Chalmers R. V. et al. *Transient changes in Respiration and Photosynthesis at Different Stages of Development of Chlorella cells.* 1954.
38. Sorokin C., Krauss R. W. *Biochim. et Biophys. Acta*, 48, № 2, 314—19, 1961.
39. Sorokin C. *J. Exp. Bot.* 12 (34): 56—64, 1961.
40. Sorokin C. and Krauss R. W. *Plant Physiol.*, 36, Suppl. XLIII, August, 27—31, 1961.
41. Sorokin C. *Nature*, № 4827, 496—97, 1962.
42. Mefferi M. E. *Arch. Mikrobiol.* 20, 410—22, 1954.
43. Pirson A. and Döring H. *Flora*, 139, 314—28, 1952.
44. Gerdes G. *Arch. Mikrobiol.*, 16, 53—77, 1951.
45. Kok B. and Oorschot J. van *Acta Botan. Neerl.*, 3, 533—46, 1954.
46. Tamiya H., Sasa T. et al. *Trans. Intern. Conf. Use Solar Energy*, Vol. 4, Tucson, Ariz. Univ. Press, 38—47, 1958.
47. Krauss R. W. *Amer. J. Bot.*, 49, № 4, 425—33, 1962.

48. Gummert F. et al. Carneg. Inst. Wash. Publ., № 600, 166—76, 1953.
49. Myers J., Phillips J. N., Graham J. R. Plant Physiol, 26, 539—48, 1951.
50. Krauss R. W. and McAleer W. J. Carneg. Inst. Wash. Publ. № 600, 316—25, 1953.
51. Ниципорович А. А. О производственной культуре одноклеточных водорослей, 1961, 25—31.
52. Evenari M., Mayer A. M., Gottesman E. Carnegle Inst. Wash. Publ. № 600, 197—203, 1953.
53. Myers J. Trans. Int. Conf. Use Solar Energy, Vol. 4, Tuscon, Ariz. Univ. Press, 1958.
54. Fisher A. W. Jr. Proceedings World Symposium on Applied Solar Energy, 243—53, 1955.
55. Тамляя Н. Proceedings World Symp. Applied Solar Energy, 231—41, 1955.
56. Митчуа А., Нуинова Т., Тамляя Н. Carneg. Inst. Wash. Publ., № 600, 273—81, 1953.
57. Русина О. Н. Всесоюзное совещание по культивированию одноклеточных водорослей. Тезисы докладов. 1961, 10.
58. Mayer A. M., Eisenberg A., Evenari M. Science monthly, 83, 198—203, № 4, 1956.
59. Владимирона М. Г. Микробиология, т. XXX, вып. 3, 1961, 431.
60. Pratt R. Am. J. Botany, 31, 418—21, 1944.
61. Wiltsh H. von, and Harder R. Carneg. Inst. Wash. Publ. № 600, 154—165, 1953.
62. Sorokin C. and Myers J. Science, 117, 330—31, 1953.
63. Sasa T., Morimura Y. and Tamlya H. J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), 1, 183—89, 1955.
64. Рубенчик Л. И., Кордюм В. А. и др. Всесоюзное совещ. по культивированию одноклет. водорослей. Тез. докл., 1961, 43.
65. Meffert M. E. Algal culture in Sewage—Proc. Sol. Energy, 1955.
66. Morimura Y., Nihel T., Sasa T. J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), 1, 173—82, 1955.
67. Meffert M. E. and Straimann H. Zentr. Bakteriол. Parasitenk. Abt. II, 108, 154—80, 1954.
68. Krauss R. W. Conf. Sol. Energy, Nov. 1, 1955.
69. Fogg G. E. and Collyer D. M. Carnegle Inst. Wash. Publ. № 600, 177—81, 1953.

70. Burlew J. S. Carnegie Inst. Wash. Publ. № 600, 235—782, 1953.
71. Пименова М. Н. и др. Микробиология, т. XXXI, вып. 2, 1962.
72. Заварзина Н. Б. и Проценко А. Е. Доклады АН СССР, 122, № 5, 1958.
73. Ли Шан Хао. Шуйшен Шенюсюс Цикань, № 4, 62—72, 1959.
74. Максимова И. В., Пименова М. Н. Всесоюзное совещание по культивир. одноклеточных водорослей, Тезисы докладов, 1961.
75. Pruess L., Arnow P. et al. Applied Microbiology, 2, 1954.
76. Ю Мин Цюань. Шуйшен Шенюсюэ Цикань, № 4, 1959, 482—88.
77. H. Nakamura. Reports Japan Microalgae Research Inst. V. 1, № 1, 1959.
78. Fisher A., Little A. Carneg. Inst. Wash. Public. № 600, p. 303, 1953.
79. Oorschot J. L. van. Conversion of Light Energy in Algal Culture, 1955.
80. Moyses A. J. Rech. C. N. R. S., № 36, 261—69, 1956.
81. Пиневиц В. В., Верзилин Н. Н. Вестник Ленинградского университета, № 15, вып. 3, 1963.
82. Kanazawa T., Fujita S., Yuhara T. a. Sasa T., J. Gen. Appl. Microbiol. (Tokyo), v. 4, № 3, pp. 135—152, 1958.
83. Nakamura H. Reports Japan Microalgae Inst., v. 2, № 1, pp. 1—12, 1961a.
84. Combs G. F. Science 116: 453—454, 1952.
85. Hayami H., Matsuno Y. and Shino K. Annual Report Nat. Inst. Nutrition, part 8, 1960.
86. Emerson R., Green L. Plant Physiology 13, 1938.
87. Emy D. M. Plant Physiology. 25, № 3, 1950.
88. Griffiths D. J. et al. Annals of Botany, 24, № 93, 1960.
89. Pearsall W. H. and Bengry R. P. Annals of Botany, № 5, 485, 1940.
90. Griffith D. J. Annals of Botany, 25, № 98: 85—93, 1961.
91. Pratt R. and Fong J. Am. J. Botany, 27, 431, 1940.
92. Spoehr H., Milner H. Plant Physiology, 1, 1949.
93. Emerson R., Arnold W. J. Gen. Physiology, 10, 1932.
94. Чесноков В. А. Вестник ЛГУ, № 9, сер. биол., вып. 2, 1962, 113—122.
95. Sorokin C. and Krauss R. Plant Physiology, Vol. 33, № 2, 1958.

96. Ничипорович А. А., Семененко В. Е., Владимиров-
ва М. Г. Известия АН СССР, сер. биол., № 2, 1962.
97. Fowden L. Nature, 167: 1030—1031, 1951.
98. Hundley J. M., Ing R. B., Krauss R. W., Science 124,
536—537, 1956.
99. Sorokin C. a. Krauss R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 45,
№ 7, p. 1740, 1959.
100. Tamiya H., Morimura Y. et al. Plant a. Cell Phys., 2,
№ 4, 383, 1961.
101. Lorenzen H. u. Ruppell H. G. Naturwissenschaft., H. 22,
553, 1958.
102. Pirson A. C. u. Senger H. Naturwissenschaft., H. 3. Jg.
48, 81, 1961.
103. Pirson A. B. u. Lorenzen H. Z. Bot., 46, H. 1, 52, 1958.
104. Morimura J. Plant a. Cell Physiology, 1, 49—63, 1959.
105. Sorokin C. Physiol. Plantarum, 10, F. 4, 659, 1957.
106. Bernstein E. Science, 131, № 3412, 1528, 1960.
107. Cook J. R., James T. W. Exp. Cell Research, 21, № 3, 583,
1960.
108. Schmidt R. R., King K. W. Blochim. et Biophys. Acta, 47,
№ 2, 391, 1961.
109. Спекторон К. С. ДАН СССР, т. 147, № 4, 1962, 967—969.
110. Iwamura T. J. Biochem., 42, № 5, 575, 1955.
111. Iwamura T. a. Myers J. Arch. Biochem. a. Biophys., 84, 2,
267, 1959.
112. Oh-hama T. a. Miyachi S. Pl. a. Cell Phystol., 1, 155, 1960.
113. Hase E., Morimura J. a. Tamiya H. Arch. Biochem. a.
Biophys. 69, Compl. 149, 1957.
114. Kanazawa T. J. Gen. a. Appl. Microbiol., 4, № 2, 1958.
115. Nihei T. J. Biochem. (Tokyo), 42, 245, 1955.
116. Hase E. et al. Blochim. et Biophys. Acta, 35, 180, 1959.
117. Hase E., Mihara S., Otsuka H. J. Gen. a. Appl. Micro-
biol., 5, 43, 1959.
118. Hase E., Morimura J. a. Tamiya H. J. Gen. a. Appl.
Microbiol., 6, 68, 1960.
119. Hase E., Mihara S., Otsuka H. a. Tamiya H. Arch.
Biochem. a. Biophys., 83, 17, 1959.
120. Mihara S., Otsuka H. a. Tamiya H. Blochim. et Biophys.
Acta, 32, 298, 1959.
121. Tamiya H. J. Japan Biochem. Soc., 35, № 3, 111—120, 1963.
122. Pirson A. B. u. Badour S. S. Flora, 150, № 2—3, 243, 1961.
123. Sorokin C. Arch. Mikrobiol., 7, H. 2, 151, 1960.

124. Sorokin C. *Physiol. Plant.*, 13, f. 4, 687, 1960.
125. Sorokin C. *Plant Physiol.*, 36, № 2, 232, 1961.
126. Sorokin C. *Science* 140 (3565): 385, 1963.
127. Sorokin C. *Arch. Mikrobiolog.* 40 (4): 418—29, 1961.
128. Ried A. et al. *Arch. Mikrobiol.* 45 (4): 345—358, 1963.
129. Björkman L., Björkman M. et al. *Acta Polytech.*, 176, 3—18, 1955.
130. Арутюнян Н. П. *Известия АН АрмССР, (биол. науки) № 5, 1965.*
131. Владимирова М. Г. и Семененко В. Е. *Интенсивная культура одноклеточных водорослей, Изд. АН СССР, 1962.*

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Предисловие	5
Культивирование одноклеточных зеленых водорослей в лабораторных условиях	7
Углеродное и минеральное питание	—
Изучение роста культур в условиях непрерывного освещения	18
Исследования по ускорению роста культур физическими и химическими средствами	23
Повседневный ритм роста культур и влияние повседневных колебаний интенсивности света и температуры	24
Синхронные культуры	26
Культивирование одноклеточных зеленых водорослей под открытым небом	34
Главные типы установок	—
Селекционные работы	44
Методика выращивания культур под открытым небом, сбор и обработка урожая	52
Урожайность культур, выращенных под открытым небом	60
Заключение	69
Литература	76

НОРАЙР ПЕТРОСОВИЧ АРУТЮНЯН

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ
ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

*Печатается по рекомендации ученого совета
Лаборатории агрохимии АН АрмССР*

Отв. редактор М. А. ТЕР-КАРАПЕТЯН
Редактор издательства Ж. В. НАЛЧАДЖЯН
Обложка художн. К. А. ЮТУДЖЯНА
Технич. редактор М. А. КАПЛАНЯН
Корректоры Г. М. АВЕТИСЯН, Д. Т. НАРИНЯН

ВФ 04648 РИСО 955 Заказ 52 Изд. № 2528 Тираж 1000

Сдано в производство 10/II 1966 г. Подписано к печати 25/VI 1966 г.
печ. л. 5,25, ус. печ. 4,3 л., бум. 2,15 л., изд. 3,53 л. Бумага № 2,
84×108¹/₁₁. Цена 25 коп.

Типография Издательства Академии наук Армянской ССР,
Ереван, ул. Барекамутиян, 24

V. 53574