Интенсивность роста *Chlorophyta* на разных культивационных средах

Леонтьева Т.А., Кирпенко Н.И.

Институт гидробиологии НАНУ,
просп. Героев Сталинграда, 12, Киев 03254, Украина
leontieva3394@gmail.com
nativnativ@ukr.net

Реферат

Исследована интенсивность роста культур зеленых микроводорослей родов *Desmodesmus* (Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald, *Scenedesmus* Meyen, *Acutodesmus* (Hegewald) Tsarenko и *Selenastrum* Reinsch. Альгологически чистые культуры микроводорослей выращивали в периодической культуре при температуре $25 \pm 0,5$ °C, освещенности 2,5 клк с чередованием свет : темнота 16 : 8, на питательных средах Фитцджеральда (в модификации Цендера и Горема), Тамия и Болда, которые существенно отличаются по содержанию основных биогенных элементов азота и фосфора. Микроскопический анализ культур в процессе выращивания показал различную интенсивность роста исследованных видов *Chlorophyta* в данных условиях. Наиболее высокие показатели интенсивности роста водорослей отмечены на среде Фитцджеральда, при этом максимальная интенсивность роста зафиксирована для представителей рода *Scenedesmus*. В то же время наблюдались видоспецифические отличия показателей в пределах рода, например интенсивность роста *S. ellipticus* Corda была выше, чем *S. obtusus* Meyen, а *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt – выше, чем *D. communis* (E.Hegewald) E.Hegewald. На среде Болда, как и на среде Фитцджеральда, наибольшей интенсивностью роста характеризовался *S. ellipticus*, тогда как на среде Тамия у него были очень низкие показатели. Среда Тамия оказалась наименее благоприятной для роста исследованных видов водорослей, за исключением *D. subspicatus*, численность которого превысила показатели других видов. В зависимости от среды изменялась также динамика роста культур, в частности длительность фаз развития.

К л ю ч е в ы е с л о в а : *Chlorophyta*, интенсивность роста, питательные среды

© Леонтьева Т.А., Кирпенко Н.И., 2020

Введение

Микроводоросли вызывают значительный интерес как активные продуценты биомассы различного назначения. Они являются сырьем для фармацевтической, косметической, пищевой промышленности и альтернативной энергетики, компонентом натуральных сбалансированных кормов для животноводства, птицеводства и рыбоводства, источником питательных и биологически активных веществ в растениеводстве, эффективным звеном в технологии очистки сточных вод и снижении выбросов углекислого газа (Кирпенко, 2004; Перспективи..., 2008; Сорокина и др., 2012; Амин-Уль Маннан и др., 2017; Doria et al., 2012; Borowitzka, Vonshak, 2017). На сегодняшний день потенциал микроводорослей используется еще недостаточно. Многие их виды обладают различным физиолого-биохимическими свойствами и могут найти практическое применение. Продолжаются исследования, направленные на поиск перспективных видов, определение оптимальных условий их выращивания, повышение урожайности и улучшение полезных свойств.

Анализ литературных данных свидетельствует о значительном биотехнологическом потенциале зеленых микроводорослей. Так, виды родов *Scenedesmus* и *Desmodesmus* отличаются значительной интенсивностью роста (Кирпенко и др., 2017), представители рода *Acutodesmus* синтезируют биомассу с высоким содержанием белков (до 53–59%), водоросли семейства *Selenastraceae* способны накапливать углеводы и липиды (до 35–38 и 44–49% соответственно).

Для определения перспективности использования исследуемых видов в биотехнологии необходимо исследовать их продукционные характеристики, установить оптимальные условия выращивания, выбрать питательные среды, обеспечивающие наиболее высокий прирост биомассы.

Целью данной работы было установить особенности роста культур ряда зеленых микроводорослей на питательных средах, отличающихся содержанием основных биогенных элементов.

Материалы и методы

Материалом для исследования интенсивности роста культур послужили зеленые микроводоросли, хранящиеся в Коллекции культур (HPDP) Института гидробиологии НАН Украины (Білоус та ін., 2018), в частности *Desmodesmus communis* HPDP-109, *D. subspicatus* HPDP-103, *Scenedesmus obtusus* HPDP-113, *S. ellipticus* HPDP-117, *Acutodesmus obliquus* HPDP-104 (*Chlorophyceae*, *Scenedesmaceae*) и *Selenastrum gracile* Reinsch HPDP-115 (*Chlorophyceae*, *Selenastraceae*).

Альгологически чистые культуры водорослей выращивали в накопительном режиме в течение 30–33 сут при температуре $25 \pm 0,5$ °C, освещении лампами ДС40 интенсивностью 2,5 клк на поверхности колб,

чередовании свет : темнота = 16 : 8 и ежедневном ручном перемешивании. В опытах использовали среды Фитцджеральда (в модификации Цендера и Горэма), Тамия и Болда (Сиренко и др., 1975) (табл. 1).

Содержание азота и фосфора в средах рассчитывали, исходя из их массовой доли в соответствующих солях с учетом молекулярных масс элементов. Культуры зеленых микроводорослей из коллекции ИГБ НАНУ обычно выращиваются на жидкой среде Фитцджеральда.

Таблица 1. Состав питательных сред

Микроэлемент	Среда		
	Фитцджеральда	Тамия	Болда
Содержание, г/л			
NaNO ₃	0,496	0,250	–
KNO ₃	–	–	5,000
KH ₂ PO ₄	–	0,175	1,250
K ₂ HPO ₄	0,039	0,075	–
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,075	0,075	2,500
CaCl ₂	0,036	0,025	–
Na ₂ CO ₃	0,020	–	–
Na ₂ SiO ₃	0,058	–	–
Железо лимоннокислое	0,006	–	–
Лимонная кислота	0,006	–	–
Трилон Б	0,001	–	0,037
NaCl	–	0,025	–
Содержание, мг/л			
H ₃ BO ₃	0,248	42,9	2,86
MnSO ₄ · H ₂ O	0,178	–	–
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,023	3,3	0,22
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,007	–	–
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,012	–	–
Na ₂ WO ₄	0,003	–	–
KBr	0,01	–	–
KI	0,007	–	–
Cd(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	0,012	–	–
NiSO ₄ · (NH ₄) ₂ SO ₄ · 6H ₂ O	0,016	–	–
VSO ₄ · 3H ₂ O	0,002	–	–
Al ₂ (SO ₄) ₃ · K ₂ SO ₄ · 24H ₂ O	0,038	–	–
Cr(NO ₃) ₃ · 7,5 H ₂ O	0,003	–	–
FeSO ₄ · 7H ₂ O	–	2,5	9
MnCl ₂ · 4H ₂ O	–	27,15	1,81
MoO ₃	–	0,27	0,018
NH ₄ VO ₃	–	0,34	0,023

Во избежание стресса при переводе их на другую среду в качестве инокулята использовали культуры после предварительного выдерживания не менее 1–2 мес на соответствующих средах. В процессе выращивания культур определяли концентрацию клеток водорослей, подсчитывая в камере Горяева (Сиренко и др., 1975). Измерения проводили в трёх повторностях, данные представлены в виде $M \pm m$ (M – среднее арифметическое; m – стандартная ошибка). Для оценки интенсивности роста культур вычисляли коэффициенты увеличения численности клеток за весь период опыта ($k = N_t/N_0$, где N_0 и N_t – концентрация клеток (млн кл/мл) в начальный и конечный период времени соответственно, t – исследуемый временной промежуток, сутки). Результаты обрабатывали статистически с использованием пакета программ Excel 2010.

Результаты и обсуждение

Исследованные культуральные среды отличаются составом анионов и катионов, но наиболее существенные их различия заключаются в разнице содержания биогенных элементов – азота и фосфора. Среда Тамия отличается меньшим количеством компонентов, однако содержит в 10–20 раз больше доступного азота и более высокую концентрацию фосфора по сравнению с двумя другими средами (табл. 2). В то же время среда Болда превосходит среду Фитцджеральда по количеству фосфора. Таким образом, среда Болда является наиболее бедной по содержанию азота, среда Фитцджеральда – по содержанию фосфора, тогда как среда Тамия значительно богаче этими макроэлементами.

Таблица 2. Содержание основных биогенных макроэлементов (г/л) в средах

Макроэлемент	Среда		
	Фитцджеральда	Тамия	Болда
Азот	0,08	0,69	0,04
Фосфор	0,007	0,285	0,053

Сравнение показателей роста исследованных видов *Chlorophyta* свидетельствует о заметных различиях в их продуктивности на разных средах. На среде Фитцджеральда все культуры имели более высокие показатели, чем на двух других средах (табл. 3).

Наибольший прирост численности клеток на среде Фитцджеральда наблюдался для водорослей рода *Scenedesmus*. В то же время *S. ellipticus*, отличавшийся максимальными показателями прироста клеток, практически вдвое превосходил другого представителя этого же рода – *S. obtusus*. Подобные видоспецифические различия наблюдались и для *Desmodesmus subspicatus* по сравнению с *D. communis*. При этом показатели прироста количества клеток *D. communis* оказались заметно ниже, чем у *Selenastrum gracile* и *Acutodesmus obliquus*.

Таблица 3. Коэффициенты увеличения численности клеток в культурах *Cyanophyta* при выращивании на разных средах

Макроэлемент	Среда		
	Фитцджеральда	Тамия	Болда
<i>Desmodesmus communis</i>	4,52±0,17	1,75±0,32	0,96±0,10
<i>D. subspicatus</i>	11,16±1,01	2,89±0,31	6,48±0,71
<i>Scenedesmus obtusus</i>	21,53±0,22	3,75±0,36	0,92±0,11
<i>S. ellipticus</i>	43,47±0,64	8,59±0,86	1,34±0,11
<i>Acutodesmus obliquus</i>	9,64±0,80	5,64±0,59	1,05±0,11
<i>Selenastrum gracile</i>	5,81±0,60	2,57±0,26	1,48±0,13

На среде Болда максимальные показатели прироста клеток были отмечены для *Scenedesmus ellipticus*, а продуктивность *S. obtusus* оказалась существенно ниже, чем *A. obliquus*. В целом, на среде Болда для исследованных культур амплитуда колебаний показателей интенсивности роста, а следовательно, и видоспецифические отличия были ниже, чем на среде Фитцджеральда – минимальные и максимальные величины отличались, соответственно, в 4,9 и 9,6 раз, что свидетельствует о более низком продукционном потенциале этой среды.

На среде Тамия максимальный коэффициент прироста плотности биомассы отмечен у *Desmodesmus subspicatus*. Его величина сопоставима с показателями наиболее продуктивных культур на среде Болда (*S. ellipticus*, *S. obtusus* и *A. obliquus*.), а также близка к коэффициентам, полученным при выращивании *Selenastrum gracile* и *D. communis* на среде Фитцджеральда. В то же время для большинства культур показатели прироста клеток на среде Тамия оказались значительно ниже, что в целом свидетельствует об очень низкой интенсивности или отсутствии роста.

На рисунке показаны различия в динамике роста культур на разных средах, при этом четко прослеживается более высокая интенсивность роста водорослей на среде Фитцджеральда. Но к концу 30-дневного опыта ни одна из культур на этой среде не достигла стационарной фазы роста. У *D. communis* и *S. ellipticus* все же наблюдается тенденция к замедлению роста (см. рисунок, А, Г) и более выражена лаг-фаза по сравнению с другими видами.

На среде Болда за исследованный период только у культуры *D. communis* (см. рисунок, А) можно выделить все основные стадии роста, что свидетельствует о более коротком периоде развития, очевидно, обусловленным недостатком питательных элементов. Однако более высокие концентрации питательных веществ на среде Тамия также не обеспечили интенсивного роста культур, за исключением *D. subspicatus* (см. рисунок, Б).

Таким образом, в данных условиях культивирования высокие концентрации биогенных элементов (азота и фосфора) не способствуют интенсивному росту *Chlorophyta*. Некоторые авторы также отмечали, что среда Тамия содержит больше питательных веществ, чем необходимо для нормального протекания фотосинтеза, что свидетельствует о не-рациональности ее использования для промышленного культивирования водорослей (Мельников и др., 2014).

Рисунок. Изменение концентрации клеток в процессе выращивания культур микроводорослей на средах Фиттджеральда (1), Болда (2) и Тамия (3): А – *Desmodesmus communis*; Б – *D. subspicatus*; Б – *Scenedesmus obtusus*; Г – *S. ellipticus*; Д – *Acutodesmus obliquus*; Е – *Selenastrum gracile*. R^2 – достоверность экспоненциальной аппроксимации среднего арифметического

Выводы

Интенсивность роста водорослей существенно зависит от состава питательной среды и характеризуется видоспецифическими особен-

ностями. В периодической культуре большинство исследованных видов водорослей лучше растут на средах с умеренными концентрациями азота и фосфора. Наибольшей интенсивностью роста на среде Фитцджеральда и Болда характеризуется *Scenedesmus ellipticus*, на среде Тамия – *Desmodesmus subspicatus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Амин-Уль Маннан М., Дипаннита Хазра, Арун Карнвал, Дибан Чакраварти Каннан. 2017. Водоросли как источник сырья для производства биотоплива. *Альгология*. 27(3): 337–356. <https://doi.org/10.15407/alg27.03.337>
- Білоус О.П., Незбрицька І.М., Ключенко П.Д., Кірпенко Н.І. 2018. *Колекція культур мікроводоростей HPDP*. Київ: Альтерпрес. 36 с.
- Кірпенко Н.І. 2004. Шляхи використання біополімерів мікроводоростей. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія*. 24(3–4): 48–52.
- Кірпенко Н.І., Усенко О.М., Т.О. Мусий Т.О. 2017. Сравнительный анализ содержания белков, углеводов и липидов в клетках зеленых микроводорослей. *Гидробиол. журн.* 53(6): 87–98. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v54.i2.80>
- Мельников С.С., Мананкина Е.Е., Самович Т.В., Козел Н.В., Шалыго Н.В. 2014. Оптимизация условий выращивания хлореллы. *Весті НАН Беларусі. Сер. біял. навук*. 3: 52–56.
- Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології*. 2008. Ред. О.К. Золотарьова. Київ: Альтерпрес. 234 с.
- Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. 1975. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*. Киев: Наук. думка. 247 с.
- Сорокина К.Н., Яковлев В.А., Пилигаев А.В., Кукушкин Р.Г., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А., Пармон В.Н. 2012. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики. *Катализ в промышленности*. 2: 63–72.
- Borowitzka A., Vonshak A. 2017. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *Europ. J. Phycol.* 52(4): 407–418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>
- Doria E., Longoni P., Scibila L., Iazzi N., Cella R., Nielsen E. 2012. Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *J. Appl. Phycol.* 24: 375–383.

Поступила 05.06.2019

Подписала в печать Е.К. Золотарева

REFERENCES

- Amin-UI Mannan M., D. Hazra, A. Karnwal, D.Ch. Kannan. 2017. Algae as a platform for biofuel production – a sustainable perspective. *Algologia*. 27(3): 337–356. <https://doi.org/10.15407/alg27.03.337>
- Bilous O.P., Nezbyrskytska I.M., Klochenko P.D., Kirpenko N.I. 2018. *Culture collection of algae HPDP*. Kyiv. 36 p. [Ukr.]
- Borowitzka A., Vonshak A. 2017. Scaling up microalgal cultures to commercial scale. *European J. Phycol.* 52(4): 407–418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>

- Doria E., Longoni P., Scibila L., Iazzi N., Cella R., Nielsen E. 2012. Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *J. Appl. Phycol.* 24: 375–383.
- Kirpenko N.I. 2004. Areas of use of microalgae biopolymers. *Nauk. zap. Ternop. nats. ped. un-tu. Ser. Biol.* 24(3–4): 48–52.
- Kirpenko N.I., Usenko O.M., Musiy T.O. 2017. Comparative analysis of the content of proteins, carbohydrates, and lipids in the cells of green microalgae. *Hydrobiol. J.* 53(6): 87–98. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v54.i2.80>
- Melnikov S.S., Manankina E.E., Samovich T.V., Kozel N.V., Shalygo N.V. 2014. Optimization of growing conditions of chlorella. *Viesci NAN Bielarusi. Sier. bijal. navuk.* 3: 52–56.
- Prospects for the use of microalgae in biotechnology.* 2008. Ed. O.K. Zolotareva. Kyiv: Alterpress. 234 p. [Ukr.].
- Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.F. 1975. *Methods of physiological/biochemical research of algae in hydrobiological practice.* Kiev: Naukova Dumka. 247 p. [Rus.].
- Sorokina K.N., Yakovlev V.A., Piligaev V.A., Kukushkin R.G., Peltek S.E., Kolchanov N.A., Parmon V.N. 2012. The potential use of microalgae as a feedstock for bioenergy. *Kataliz v promyshlennosti.* 2: 63–72.

Leontieva T.A., Kirpenko N.I.

Institute of Hydrobiology, NAS of Ukraine,
12 Geroev Stalingrada Ave., Kiev 03254, Ukraine

***Chlorophyta* growth rate on different cultivation media**

The growth rates (GR) of green microalgae cultures of the genera *Desmodesmus* (Chodat) S.S.An, T.Friedl & E.Hegewald, *Scenedesmus* Meyen, *Acutodesmus* (Hegewald) Tsarenko, and *Selenastrum* Reinsch were studied. Algologically pure cultures of microalgae were grown in batch culture at a temperature of 25 ± 0.5 °C, illumination 2500 lx with alternating light: darkness 16 : 8 h, on various cultural media (Fitzgerald in modification of Zehnder and Gorham, Tamiya and Bold), which differ significantly in content of basic nutrient elements: nitrogen and phosphorus. Microscopic analysis of cultures during cultivation showed noticeable differences in the GR of the studied species of microalgae under these conditions. The highest GR values were recorded on Fitzgerald medium with representatives of the genus *Scenedesmus* leading in GR values. At the same time, species-specific differences were observed within the studied genera. For example, the GR of *Scenedesmus ellipticus* Corda was higher than *S. obtusus* Meyen, and *Desmodesmus subspicatus* (Chodat) E.Hegewald & A.Schmidt had higher GR compared to *D. communis* (E.Hegewald) E.Hegewald. On the Bold medium, as well as on the Fitzgerald medium, *S. ellipticus* was characterized by the highest GR, while on the Tamiya medium it had very low rates. The Tamiya medium turned was the least favorable for growth of the studied microalgae species, with the exception of *D. subspicatus*; its number exceeded those of other species. Depending on the nutrient medium, the dynamics of culture growth also changed, in particular, the duration of the development phases.

Key words: *Chlorophyta*, growth rate, nutrient media