

## ФОТОАВТОТРОФНЫЙ И МИКСОТРОФНЫЙ РОСТ *TETRASELMIS VIRIDIS* В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Жондарева Я.Д.<sup>1</sup>, Тренкеншу Р.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУН Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН  
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ

e-mail: yana.zhondareva@yandex.ru

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

e-mail: trenkens@yandex.ru

**Аннотация.** Экспериментально определена динамика роста микроводоросли *Tetraselmis viridis* в накопительном режиме культивирования. Определены максимальная продуктивность и максимальная плотность культуры при фотоавтотрофном и миксотрофном культивировании. Показано, что рост микроводорослей на среде с источником углерода в органической форме выше по сравнению с ростом без органического углерода. Максимальная продуктивность (0.28 г АСВ/(л·сут<sup>-1</sup>)) и максимальная плотность (3.1 г АСВ/л) культуры в 1.5 раза выше при культивировании микроводорослей с добавлением органического источника углерода и энергии, чем при фотоавтотрофном росте. Сделан вывод, что добавление в среду источников углерода органического происхождения приводит к улучшению роста фотосинтезирующих организмов.

**Ключевые слова:** *Tetraselmis viridis*, накопительная культура, углерод, максимальная продуктивность, плотность культуры.

## PHOTOAUTOTROPHIC AND MIXOTROPHIC GROWTH OF *TETRASELMIS VIRIDIS* IN BATCH CULTURE

Zhondareva Ya.D.<sup>1</sup>, Trenkenshu R.P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Marine Biological Studies named A.O. Kovalevsky RAS

Nakhimov Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia

e-mail: yana.zhondareva@yandex.ru

<sup>2</sup> Sevastopol State University

Universitetskaya St., 33, Sevastopol, 299053, Russia

e-mail: trenkens@yandex.ru

**Abstract.** The dynamics of the growth of microalgae *Tetraselmis viridis* in the batch culture has been experimentally determined. The maximum productivity and maximum density of the culture under photoautotrophic and mixotrophic cultivation have been determined. It is shown that the microalgae growth in the media with organic carbon source is higher compared to growth without organic carbon. The maximum productivity (0.28 g ACB/(l·day)) and maximum biomass (3.1 g ACB/l) of culture were higher in 1.5 times under microalgae's culture with organic carbon and energy sources compared to photoautotrophic growth. It has been concluded that the addition of organic carbon sources in media resulting in improved growth of photosynthetic organisms.

**Key words:** *Tetraselmis viridis*, batch culture, carbon, maximum productivity, density of the culture.

Микроводоросли являются ценным источником полиненасыщенных жирных кислот, незаменимых аминокислот, пигментов, благодаря чему спрос на их использование в качестве пищевых и кормовых добавок в промышленных странах увеличивается [1]. Как и все живые организмы, они нуждаются в энергии для поддержания своей жизнедеятельности и углероде для построения своей биомассы [2].

Так как большинство микроводорослей – это фотоавтотрофные организмы, их культивируют на солнечном свете или при искусственном освещении. Однако недостаток света угнетает рост фототрофов, снижая продуктивность культуры при увеличении её плотности, достигая светового компенсационного пункта. При повышении плотности культуры может быть достигнут другой компенсационный пункт – углекислотный. Поэтому для фотоавтотрофных видов водорослей существенными факторами являются интенсивность освещения и углекислый газ, являющийся основным углеродным субстратом для роста автотрофных микроводорослей. За исключением двуокси углерода, все необходимые элементы питания, могут быть внесены в фотобиореакторы в любом необходимом количестве без изменения любых других физических характеристик системы, таких как температура, pH и т.д. Добавление органического источника углерода может сделать рост водорослей независимым как от света, так и от подачи CO<sub>2</sub>.

Для многих видов водорослей продемонстрирован такой подход к выращиванию как альтернатива фотоавтотрофному росту. Скорость роста и накопления биомассы для некоторых водорослей в миксо- или гетеротрофных условиях может быть в несколько раз выше, чем при фотоавтотрофном культивировании [3, 4], но синтез продуктов обмена веществ, таких как липиды и пигменты, находится под влиянием качества и количества органического углерода. Например, скорость роста и продуктивность *Nitzschia laevis* и *Tetraselmis suecica* как в гетеро-, так и в миксотрофных условиях может быть в два раза выше, чем в фототрофных условиях [3, 5]. С другой стороны, не все водоросли могут успешно расти в абсолютной темноте. Например, *Nannochloropsis sp.* растет медленно в таких условиях [6], а *Phaeodactylum tricornutum* не растет вообще в

гетеротрофных условиях с органическим углеродом в среде, но его рост выше при миксотрофном выращивании, по сравнению с фотоавтотрофным.

Органические вещества, применяемые при миксотрофном культивировании микроводорослей должны быть простыми для стерилизации и обеспечивать хороший рост и синтез биопродуктов [7]. Обычно используются в качестве источника органического углерода глюкоза, глицерин и ацетат. Однако ацетат обычно подавляет рост морских микроводорослей [8, 9], но он усиливает рост пресноводных водорослей [10].

На сегодняшний день наши знания об оптимальных требованиях роста микроводорослей в миксо- или гетеротрофных условиях ограничены особенностями видов водорослей. В этом исследовании мы использовали зеленые морские микроводоросли *Tetraselmis viridis* в качестве представителя водорослей, используемых для производства пищевых добавок и живого корма в аквакультуре, чтобы изучить возможность использования органического углерода в среде для увеличения скорости роста и продуктивности.

**Объекты и методы исследования.** Экспериментальная работа проводилась на базе отдела Биотехнологий и фиторесурсов ФГБУН «Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского» РАН. В эксперименте использовалась альгологически чистая культура зеленой жгутиковой микроводоросли *Tetraselmis viridis* из коллекции культур микроводорослей музея ИМБИ им. А.О. Ковалевского.

Культивирование осуществляли в накопительном режиме на питательной среде, разработанной для данного вида водорослей [11, 12] в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа объемом 1 л с толщиной слоя культуры 2 см [13]. Этот объем поддерживали на протяжении всего эксперимента, доливая перед отбором проб для проведения измерений дистиллированную воду до отметки 1 л, чтобы компенсировать испарение. Температуру стабилизировали на уровне 27-29 °С. Эксперимент проводили в условиях круглосуточного освещения. Интенсивность освещения на поверхности культуры регистрировали однократно при помощи люксметра Ю-116, с погрешностью не более 5 % от измеряемой величины. Средняя освещенность на протяжении всего эксперимента составляла 8 клк. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали воздухом с помощью компрессорной установки. В качестве органического источника углерода и энергии использовали глицерин в концентрации, рассчитанной исходя из потребностей микроводорослей в углероде [14].

В процессе культивирования осуществляли ежесуточный контроль прироста культуры микроводорослей, на основании которого были построены графики, отображающие рост *Tetraselmis viridis*. Ежедневно отбирали пробы, в которых измеряли оптическую плотность культуры на длине волны 750 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3, сырой и сухой вес микроводорослей методом осаждения клеток на центрифуге и прямого взвешивания на аналитических весах.

Биомассу (абсолютно сухой вес) вычисляли, используя коэффициент перехода от оптической плотности [15]:

$$k_{D750} = 0,82 \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед.опт.пл.}^{-1}$$

Аппроксимированием линейной фазы роста определяли максимальную продуктивность культуры микроводорослей [11]:

$$B = P_m \times t + B_0,$$

где  $B$  – биомасса, мг · л<sup>-1</sup>;  $P_m$  – максимальная продуктивность, мг · л<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup>;  $t$  – время, ч.;  $B_0$  – биомасса в начале линейной фазы роста, т.е. при  $t = t_0$ .

**Результаты и обсуждения.** Экспериментальную работу провели в трех вариантах. Во всех трех опытах вначале микроводоросли выращивали в одинаковых условиях, подавая углерод посредством барботирования культуры воздухом. При этом получили одинаковый линейный рост и максимальную плотность культуры. Максимальная плотность культуры составила 1.2 г АСВ / л, а максимальная продуктивность – 0.1 г АСВ / (л·сут).

Ограничение плотности культуры предположили лимитом потока углерода с воздухом. В этом случае компенсационный пункт по углероду характеризуется равенством максимальной продуктивности и расходом углерода на дыхание в виде потери биомассы:

$$P_m = \mu_r B_m,$$

где  $B_m$  – максимальная плотность культуры, г АСВ / л;  $\mu_r$  – удельная скорость дыхания, сут<sup>-1</sup>.

Удельная скорость дыхания во всех опытах составила 0,08 сут<sup>-1</sup>. В первом опыте для увеличения потока углерода использовали распылитель, который обеспечивал более высокую растворимость CO<sub>2</sub> в культуре за счет меньшего объема пузырьков воздуха при том же общем потоке воздуха в фотобиореактор. В результате рост культуры продолжился. При этом максимальная плотность увеличилась до 2.1 г АСВ/л, а продуктивность – в 1.5 раза до 0.15 г АСВ/(л·сут). Удельная скорость дыхания составила величину около 0.07 сут<sup>-1</sup>, близкую к первоначальной. Результаты показаны на рисунке 1. Полученные результаты подтвердили предположение, что лимитирующим фактором является углеродное питание клеток.

В следующем опыте увеличили углеродное обеспечение за счет подачи 2 % CO<sub>2</sub> в воздухе, в результате чего наблюдалось продолжение роста культуры микроводорослей, указывая на увеличение максимальной плотности до 2.6 г АСВ/л и продуктивности до 0.23 г АСВ/(л·сут), что продемонстрировано на рисунке 2. Величина удельной скорости дыхания (0.08 сут<sup>-1</sup>) сопоставима с первоначальными значениями и идентична

данной величине в первом опыте. Таким образом, результаты этого опыта также подтвердили предположение, что линейный рост микроводорослей зависит от их газового питания [16].

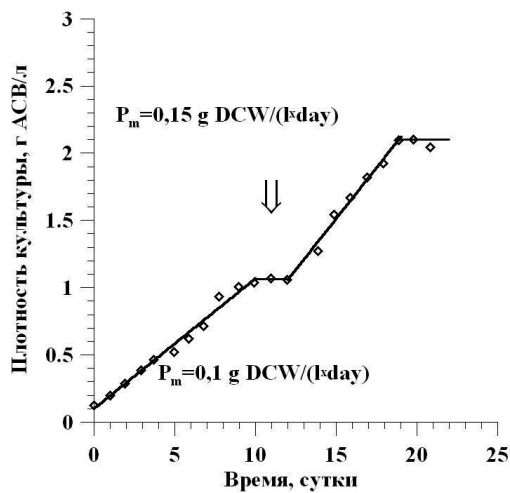


Рисунок 1 – Динамика плотности культуры *T. viridis* при барботировании воздухом. Стрелкой указан переход на подачу воздуха с помощью распылителя

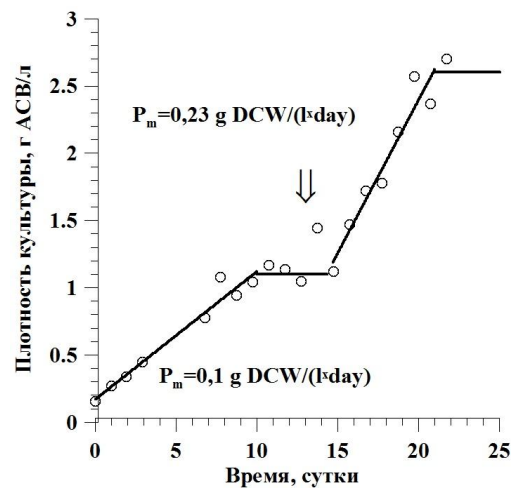


Рисунок 2 – Динамика плотности культуры *T. viridis* при переходе от барботирования воздухом на подачу воздуха, обогащенного 2 % CO<sub>2</sub> по объему (переход указан стрелкой)

В третьем опыте использовали глицерин в качестве органического источника углерода, который одновременно может быть и энергетическим источником. Глицерин вносили в количестве 5.575 г/л. Такое количество глицерина обеспечивало концентрацию около 2 г/л углерода. Вместе с этим глицерин обеспечивал около 35 ккал/л энергетического субстрата. Считая, что биомасса микроводорослей состоит на 50% из углерода, такое его количество обеспечит прирост биомассы клеток до 4 г/л. Приняв калорийность биомассы 5 ккал/г, можно получить около 8 г АСВ/л. Учитывая расходы на дыхание и коэффициент использования глицерина (40 %) в производстве биомассы микроводорослей, полученный из литературных источников [17], можно предположить, что прирост плотности культуры составит около 2 г АСВ/л. Опыт показал правильность такого предварительного расчета.

В результате этого опыта культура выросла до максимальной плотности 3.1 г АСВ/л с линейной скоростью роста, равной 0.28 г АСВ/(л·сут) (см. рис. 3). При этом удельная скорость дыхания также составила величину около 0.08 сут<sup>-1</sup>.

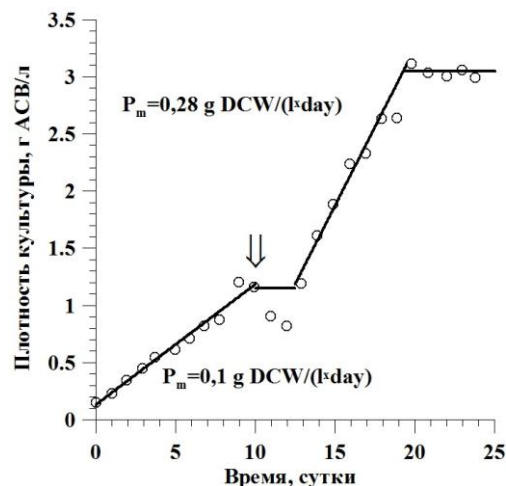


Рисунок 3 – Динамика плотности культуры *T. viridis* при переходе от барботирования воздухом на питание углеродом в органической форме (переход указан стрелкой)

На рисунке 3 видно, что с добавлением глицерина как источника углерода и энергии начался линейный рост, указывая на то, что фототрофы начали использовать органический углерод для роста.

**Заключение.** Полученные результаты показали, что рост микроводорослей зависит от способа обеспечения клеток углеродом. Максимальная продуктивность и максимальная плотность культуры при газовом обеспечении лимитируется потоком углерода с воздухом. Наблюдаемый углекислотный

компенсационный пункт фотосинтеза связан с удельной скоростью дыхания, и во всех вариантах она была одинаковой ( $0.08 \text{ сут}^{-1}$ ).

Экспериментально показано, что высокие скорости роста могут быть достигнуты при низкой освещенности при миксотрофном культивировании ( $0.28 \text{ г АСВ/(л·сут)}$ ), используя глицерин как источник углерода в органической форме, достигнув максимальной плотности  $3.1 \text{ г АСВ/л}$ , что в 1.5 раза выше по сравнению с фотоавтотрофным ростом микроводорослей.

Таким образом, посредством добавления в среду источников углерода органического происхождения можно потенциально улучшить рост фотосинтезирующих организмов и увеличить их продуктивность.

#### Список литературы / References:

1. Бигон М., Харпер Дж., Таунсенд К. *Экология. Особи, популяции и сообщества*: В 2-х т. Т.2: Пер. с англ. М.: Мир, 1989, 160 с. [Begon M., Harper J., Townsend C. *Ecology. Individuals, Populations and Communities*: In 2 Vols. Volume 2: Tr. from English. М.: Мир, 1989, 160 p. (In Russ.)]
2. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. *Micro-algal biotechnology*. 1988, pp. 153-196.
3. Wen Z.-Y., Chen F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnology Letters*, 2000, vol. 22, no. 9, pp. 727-733.
4. Heredia-Arroyo T., Wei W., Ruan R., Hu B. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* and its potential application for the oil accumulation from non-sugar materials. *Biomass and Bioenergy*, 2011, vol. 35, no. 5, pp. 2245-2253.
5. Azma M., Mohamed M.S., Mohamad R., Rahim R.A., Arif A. B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, vol. 53, no. 2, pp. 187-195.
6. Fang X., Wei C., Zhao-Ling C., Fan O. Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp. *Journal of Applied Phycology*, 2004, vol. 16, no. 6, pp. 499-503.
7. Garcia M.C., Camacho F.G., Miron A.S., Sevilla J.M.F., Chisti Y., Grima E.M. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol*, 2006, vol. 16, no. 5, pp. 689-694.
8. Wood B.J.B., Grimson P.H.K., German J.B., Turner M. Photoheterotrophy in the production of phytoplankton organisms. *Journal of Biotechnology*, 1999, vol. 70, no. 1-3, pp. 175-183.
9. Xu F., Hu H.-H., Cong W., Cai Z.-L., Ouyang F. Growth characteristics and eicosapentaenoic acid production by *Nannochloropsis* sp. in mixotrophic conditions. *Biotechnology Letters*, 2004, vol. 26, no. 1, pp. 51-53.
10. Orosa M., Franqueira D., Cid A., Abalde J. Carotenoid accumulation in *Haematococcus pluvialis* in mixotrophic growth. *Biotechnology Letters*, 2001, vol. 23, no. 5, pp. 373-378.
11. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура. *Экология моря*, 2005, т. 67, с. 89-97. [Trenkenshu R.P The simplest models of microalgae growth. 1. Periodic culture. *Sea Ecology*, 2005, vol. 67, pp. 89-97 (In Russ.)]
12. Тренкеншу Р.П. *Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: спец. 03.00.02 «Биофизика». Красноярск, 1984, 28 с. [Trenkenshu R.P *Growth and photoenergy characteristics of marine microalgae in a dense culture*: Abstract. diss. ... cand. biol. Sciences: Spec. 03.00.02 "Biophysics". Krasnoyarsk, 1984, 28p. (In Russ.)]
13. Тренкеншу Р.П., Боровков А.Б., Лелеков А.С. *Унифицированная лабораторная установка для исследования низших фототрофов*. Севастополь: Изд-во ИнБЮМ НАНУ, 2009, 40 с. [Trenkenshu R.P, Borovkov A.B, Lelekov A.S. *Standardized laboratory installation for the study of the lower phototrophs*. Sevastopol: Publishing House of the IBSS, 2009, 40 p. (In Russ.)]
14. Mirón A.S., Garcia M.C., Gómez A.C., Camacho F.G., Grima E.M., Chisti, Y. Shear Stress Tolerance and Biochemical Characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in Quasi Steady-state Continuous Culture in Outdoor Photobioreactors. *Biochem. Eng. J.*, 2003, vol. 16, pp. 287-297.
15. Боровков А.Б., Геворгиз Р.Г. Продуктивность *Spirulina platensis* и *Tetraselmis viridis* при использовании различных методов культивирования. *Экология моря*, 2005, т. 70, с. 9-13. [Borovkov A.B., Gevorgiz R.G. Productivity of *Spirulina platensis* and *Tetraselmis viridis* by using different methods of cultivation. *Sea Ecology*, 2005, vol. 70, pp. 9-13. (In Russ.)]
16. Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста. 4. Экспоненциальная и линейная фазы роста. *Экология моря*, 2007, вып. 74, с. 47-49. [Lelekov A.S, Trenkenshu R.P The simplest models of growth. 4. Exponential and linear growth phases. *Sea Ecology*, 2007, vol. 74, pp. 47-49. (In Russ.)]
17. Wen Z.Y., Chen F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. *Biotechnology Letters*, 2000, vol. 26 (1), pp. 727-733.