

УДК 581.14, 58.03

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И ИНТЕНСИВНОСТИ БАРБОТАЖА НА ДИНАМИКУ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РОСТА ХЛОРЕЛЛЫ

Н.П. ДМИТРОВИЧ, А.С. КРЫЛЬЧУК, Н.А. СИМОНЧИК

*Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь*

Введение. Водоросли являются богатейшим источником витаминов, белковых веществ, микроэлементов и других биологически активных веществ. Основным их достоинством является лабильность химического состава и биохимическое разнообразие пигментов, что позволяет осуществлять управляемый биосинтез ценных химических природных соединений [1, 2].

Данные о составе, концентрации и соотношении растительных пигментов в клетках различных водорослей, например, хлореллы, широко используются в альгологии как показатель их физиологического состояния [3]. Отмечено, что периодам интенсивного развития водорослей соответствует увеличение концентрации пигментов в их клетках. Это даёт возможность судить о продуктивности микроводорослей по концентрации хлорофилла, главным образом, хлорофилла *a* [4].

Пигментный состав водорослей весьма разнообразен. Однако обязательным для всех является хлорофилл *a*. Традиционный метод для количественного определения хлорофилла и других пигментов – это спектрофотометрический анализ. Концентрацию пигментов определяют путем измерения оптической плотности образца при конкретной длине волны и используют стандартные уравнения непосредственно для расчета концентрации пигментов. Однако было обнаружено, что этот метод иногда может давать неточные результаты, так как поглощение и излучение полос других пигментов пересекаются с хлорофиллом [5].

Немаловажное значение для определения физиологического состояния микроводорослей имеет определение соотношения общих каротиноидов к хлорофиллу *a* (C_k/C_{chl}) [6, 7]. Каротиноиды являются более стабильным компонентом пигментной системы водорослей, чем хлорофилл *a*. Усиление в клетках процессов каротиногенеза или разрушения хлорофилла свидетельствует о замедлении уровня метаболизма и ухудшении физиологического состояния водорослей [3]. Этим объясняется то, что при старении популяций фитопланктона или при неблагоприятных воздействиях факторов среды, способствующих деструкции хлорофилла *a*, величина отношения (C_k/C_{chl}) возрастает (то же отмечено и для суспензии микроводорослей в процессе культивирования). Отношение C_k/C_{chl} при разных условиях может колебаться в достаточно широких пределах. Однако среднее его значение для отдельных видов морского и пресноводного фитопланктона варьирует слабо и находится в основном в пределах 0,28 – 0,40 [8]. Принято считать, что повышение данного индекса свидетельствует об ухудшении физиологического состояния и «старении» фитопланктона, а также увеличении его пигментного разнообразия [9]. Следует отметить также, что количественное соотношение различных групп пигментов в фотосинтетическом аппарате водорослей напрямую влияет на их фотосинтетическую активность, а, следовательно, и на продуктивность фотосинтеза и последующий рост биомассы [10].

Далеко не каждый выделенный из природы вид, разновидность или штамм могут отвечать требованиям промышленного культивирования. Многие известные виды микроводорослей довольно требовательны к условиям культивирования: уровню освещения, составу питательной среды, концентрации углекислого газа, механическому перемешиванию, что в значительной мере препятствует их эффективному выращиванию [11]. Зеленая одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris* Beyer. на протяжении довольно долгого периода времени является объектом биотехнологии и широко применяется в качестве витаминно–минеральной добавки для сельскохозяйственных животных, птицы и рыб, а также при производстве препаратов в химической и фармацевтической промышленности [2].

Выращивание хлореллы в лабораторных условиях связано со значительными затратами на электроэнергию, используемую для обеспечения освещения и барботажа, и химические реагенты, входящие в состав питательных сред [12].

Таким образом, исследования, направленные на поиск оптимального режима продувки и состава питательных сред, состоящих из дешевых реагентов и обеспечивающих быстрый рост клеток водорослей при их культивировании, весьма актуальны.

Методика и объекты исследования. Объектом исследований служила культура *Chl. vulgaris*, штамм IBCE C-19 из коллекции водорослей Института биофизики и клеточной инженерии НАНБ. Водоросль выращивали в накопительном режиме в сосудах (V=1 л) при температуре 25±1°C. Культивирование вели при соблюдении следующих условий: фотопериод (свет/темнота, ч) – 16/8 часов (регулировали автоматически, используя реле времени), газоразрядные ртутные лампы низкого давления холодного дневного света Philips TDL18W/3, при этом освещённость на поверхности сосудов составляла 5000 Лк (регистрировали с помощью люксметра Ю-116). Для культивирования использовали 6 видов питательных сред: среда №1 (модифицированная среда Тамийя), среда №2 (удобрение “Kristallon”), Тамийя (среда №3), *Chlorella medium* (среда №4), BG-11 (среда №5) [13], Чу-10 (среда №6) [14]. Также при выращивании водоросли использовали различную степень интенсивности продувки воздухом: 1) без барботажа; 2) 40–45 л/ч; 3) 60–65 л/ч. За показатель продуктивности принимали сухую биомассу, которую определяли ежедневно согласно методике описанной Kusumaningrum и др. [15].

Для определения качественного и количественного состава пигментов использовали стандартный спектрофотометрический метод. Для определения оптической плотности исследуемых растворов при определённых длинах волн применяли спектрофотометр SP8000. При обработке полученных результатов концентрацию хлорофиллов *a*, *b*, *c* и каротиноидов рассчитывали по формулам, рекомендованным рабочей группой при ЮНЕСКО [16]. Отношения оптических плотностей экстрактов, косвенно отражающие соотношения концентраций пигментов, могут служить показателями физиологического состояния, структуры и разнообразия фитопланктонного сообщества. В данном исследовании был использован индекс E480/E663, который характеризует соотношение общих каротиноидов и хлорофилла *a*. Определение количественного содержания фотосинтетических пигментов проводили через 1 день.

Эксперимент проводили в 3-кратной биологической повторности. При статистической обработке результатов использовали программу Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение. В ходе проведения эксперимента установлено, что интенсивность продувки воздухом влияет на динамику биомассы и скорость роста клеток водоросли. Максимальные значения сухой биомассы были отмечены при применении интенсивной продувки (60–65 л/ч, «продувка №3»). Это значительно выше, чем при использовании средней степени интенсивности барботажа (40–45 л/ч, «продувка №2») и при полном отсутствии продувки («продувка №1») (Таблица 1).

Таблица 1 – Сухая биомасса (в граммах) хлореллы при культивировании на различных типах питательных сред и при различной интенсивности продувки

Продувка	Среда					
	№1	№2	№3	№4	№5	№6
№1	0,142±0,037	0,125±0,043	0,346±0,076	0,386±0,085	0,453±0,101	0,362±0,102
№2	0,301±0,063	0,279±0,046	0,460±0,078	0,489±0,074	0,404±0,057	0,335±0,055
№3	0,565±0,082	0,564±0,093	0,672±0,089	0,705±0,117	0,582±0,104	0,622±0,106

Примечание – все приведенные данные достоверно различны при $p < 0,05$.

На динамику биомассы оказывало влияние качество питательной среды, используемой при культивировании. Пик роста сухой биомассы хлореллы при выращивании на среде №1 и среде №2 был отмечен на 12-й день, при применении сред №3 и №4 – на 7-й день культивирования, а при использовании сред №5 и №6 – на 4-й день выращивания. Максимальное количество сухой биомассы при культивировании на средах №1 и №2 составило 1,3185±0,2448 мг/л и 1,4963±0,5151 мг/л соответственно, при применении сред №3 и №4 – 1,4000±0,4163 мг/л и 1,8667±0,0667 мг/л соответственно, а при использовании сред №5 и №6 составило 1,8667±0,5033 мг/л и 1,3111±0,7954 мг/л соответственно. Однако в этом случае культивирования с использованием сред №5 и №6 наблюдали более быстрое отмирание клеток и отсутствие роста биомассы.

Использование двухфакторного дисперсионного анализа позволило (при $p < 0,05$) установить достоверное влияние факторов «интенсивность продувки» и «вид среды» на прирост биомассы водоросли в процессе культивирования (Таблица 2).

Таблица 2 – Влияние исследуемых факторов на прирост сухой биомассы

Источник варьирования	Количество степеней свободы	Средний квадрат	Значение р (по точному критерию Фишера)
Общее	1	50,6653	0,0000
Фактор А (интенсивность продувки)	2	2,4471	0,0000
Фактор В (вид среды)	5	0,3257	0,0071
АхВ	10	0,0580	0,8289
Случайные отклонения	252	0,0999	–

Как уже отмечали ранее, тип питательной среды и интенсивность продувки оказывают достоверное влияние на прирост биомассы, однако совместного влияния этих двух факторов на данный параметр роста хлореллы выявлено не было.

Анализ результатов исследований показал, что интенсивность продувки воздухом и состав питательной среды для культивирования влияет на количественное содержание различных фотосинтетических пигментов микроводоросли хлореллы (Таблица 3).

Таблица 3 – Количественное содержание фотосинтетических пигментов хлореллы при различных условиях культивирования

Среда	Хлорофилл <i>a</i> , мг/л	Хлорофилл <i>b</i> , мг/л	Хлорофилл <i>c</i> , мг/л	Каротиноиды, мг/л	
Продувка №1	1	2785,4±3288,9	931,3±110,3	428,3±83,6	2287,7±268,7
	2	2900,1±276,6	964,4±104,6	246,5±52,9	2006,7±193,1
	3	6762,8±755,3	2133,5±275,2	824,3±175,0	4855,8±331,8
	4	4548,9±425,0	1337,6±118,7	583,6±160,7	2880,0±228,0
	5	2443,9±229,6	682,1±69,1	822,8±98,2	2027,7±189,9
	6	3223,3±756,5	1032,1±221,9	569,4±92,5	3012,4±566,4
Продувка №2	1	12721,4±1740,4	4238,3±618,0	670,6±171,5	8055,2±1072,5
	2	10440,9±1140,6	3269,2±354,6	341,3±79,8	7161,4±740,4
	3	8467,7±839,1	2626,1±290,1	579,6±238,6	5550,6±527,6
	4	6940,0±757,2	2526,8±269,6	1290,4±278,6	6856,9±495,3
	5	4421,3±892,7	1455,4±279,4	661,7±110,1	3277,5±634,4
	6	6227,6±1018,4	1855,8±343,9	656,7±212,7	5615,4±776,0
Продувка №3	1	17765,3±2803,8	5815,6±923,9	985,6±248,9	12476,3±1936,9
	2	20374,0±3457,2	6832,7±1343,3	1463,3±536,6	14640,8±2769,6
	3	8579,4±835,1	2810,0±248,7	1131,6±204,1	7348,6±441,5
	4	9218,4±1103,8	3554,2±515,6	1203,2±180,7	9431,0±1344,3
	5	8177,7±1298,8	2780,3±375,2	822,8±98,2	7065,3±951,4
	6	4802,7±888,1	1475,6±282,3	569,3±92,5	4927,6±768,8

Примечание – все приведенные данные достоверно различны при $p < 0,05$.

Максимальное количественное содержание всех исследуемых пигментов в клетках хлореллы отмечали при применении продувки интенсивностью 60–65 л/ч («продувка №3»), чем при использовании барботажа средней степени интенсивности (40–45 л/ч, «продувка №2») и при полном отсутствии продувки («продувка №1»). Изучение влияния состава используемой питательной среды на уровень накопления пигментов показало, что максимальное количество каротиноидов и хлорофиллов *a* и *b* регистрировалось при использовании питательных сред №1 и №2, а для максимального накопления хлорофилла *c* оптимальной оказалась среда №4.

Использование двухфакторного дисперсионного анализа позволило (при $p < 0,05$) достоверное установить влияние факторов «интенсивность продувки» и «вид среды» на количественное содержание фотосинтетических пигментов водоросли в процессе культивирования (Таблица 2).

Причем для всех фотосинтетических пигментов (за исключением хлорофилла *c*) было отмечено также совместное влияние двух факторов: «интенсивность продувки» и «вид среды» (Таблица 4).

Таблица 4 – Влияние исследуемых факторов на количественное содержание фотосинтетических пигментов

Источник варьирования	Количество степеней свободы	Средний квадрат	Значение <i>p</i> (по точному критерию Фишера)
Хлорофилл <i>a</i>			
Общее	1	7,7099*10 ⁹	0,0000
Фактор А (интенсивность продувки)	2	6,2860*10 ⁸	0,0000
Фактор В (вид среды)	5	1,7023*10 ⁸	0,0000
АхВ	10	8,7294*10 ⁷	0,0000
Случайные отклонения	108	1,2904*10 ⁷	–
Хлорофилл <i>b</i>			
Общее	1	8,3441*10 ⁸	0,0000
Фактор А (интенсивность продувки)	2	7,6673*10 ⁷	0,0000
Фактор В (вид среды)	5	1,9176*10 ⁷	0,0000
АхВ	10	9,3103*10 ⁶	0,0000
Случайные отклонения	108	1,6465*10 ⁶	–
Хлорофилл <i>c</i>			
Общее	1	7,4611*10 ⁷	0,0000
Фактор А (интенсивность продувки)	2	2,2798*10 ⁶	0,0007
Фактор В (вид среды)	5	4,7693*10 ⁵	0,1594
АхВ	10	6,2537*10 ⁵	0,0278
Случайные отклонения	108	2,9343*10 ⁵	–
Каротиноиды			
Общее	1	4,6609*10 ⁹	0,0000
Фактор А (интенсивность продувки)	2	4,3952*10 ⁸	0,0000
Фактор В (вид среды)	5	5,1088*10 ⁷	0,0000
АхВ	10	3,4885*10 ⁷	0,0000
Случайные отклонения	108	7,3017*10 ⁶	–

Совместное влияние двух вышеперечисленных факторов проявилось в том, что максимальные показатели зарегистрированы при использовании интенсивности продувки 60–65 л/ч («продувка №3») и питательных сред №2 (14640,8±2769,6 мг/л, 20374,0±3457,2 мг/л и 6832,7±1343,3 мг/л для каротиноидов, хлорофиллов *a* и *b* соответственно) и №1 (12476,3±1936,9 мг/л, 17765,3±2803,8 мг/л и 5815,6±923,9 мг/л для каротиноидов, хлорофиллов *a* и *b* соответственно). Для максимального накопления хлорофилла *c* оптимальными оказались среда №2 (1463,3±536,6 мг/л) и №4 (1203,2±180,7 мг/л) в сочетании с интенсивностью барботажа 60–65 л/ч («продувка №3»).

Важным показателем физиологического состояния хлореллы на протяжении периода культивирования был показатель желто–зеленого индекса (Таблица 5).

Таблица 5 – Соотношение фотосинтетических пигментов (желто–зеленый индекс)

Продувка	Среда					
	№1	№2	№3	№4	№5	№6
№1	0,815±0,016	0,702±0,043	0,751±0,063	0,643±0,041	0,830±0,019	0,990±0,057
№2	0,639±0,023	0,692±0,031	0,666±0,037	1,011±0,044	0,759±0,047	0,928±0,053
№3	0,703±0,035	0,699±0,031	0,876±0,036	1,020±0,069	0,885±0,035	1,072±0,099

Примечание – все приведенные данные достоверно различны при $p < 0,05$.

Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ позволил (при $p < 0,05$) установить достоверное влияние факторов «интенсивность продувки» и «вид среды» на такой показатель как желто–зеленый индекс (Таблица 6).

Таблица 6 – Влияние исследуемых факторов на соотношение фотосинтетических пигментов (желто–зеленый индекс)

Источник варьирования	Количество степеней свободы	Средний квадрат	Значение р (по точному критерию Фишера)
Общее	1	83,8406	0,0000
Фактор А (интенсивность продувки)	2	0,1144	0,0011
Фактор В (вид среды)	5	0,2707	0,0000
АхВ	10	0,0817	0,0000
Случайные отклонения	108	0,0157	–

Самые низкие значения желто–зеленого индекса отмечены при культивировании на питательных средах №1 (0,639±0,023) и №3 (0,666±0,037), с использованием интенсивности продувки 40–45 л/ч («продувка №2»), что свидетельствовало о хорошем физиологическом состоянии клеток суспензии с возможным потенциалом роста, но с недостаточным количеством фотосинтетических пигментов в клетках.

Выводы. Проведенные исследования влияния питательной среды и интенсивности барботажа на динамику роста, величину биомассы и динамику количественного содержания фотосинтетических пигментов хлореллы показали, что:

1) статистически значимое влияние на рост биомассы и количественное содержание фотосинтетических пигментов в клетках хлореллы оказывают факторы: интенсивность барботажа и вид питательной среды, для последнего из них отмечено также совместное влияние обоих факторов;

2) увеличение интенсивности продувки суспензии хлореллы приводит к более быстрому накоплению биомассы и сокращению необходимого времени культивирования, а также к более быстрому накоплению фотосинтетических пигментов (хлорофиллов и каротиноидов), но и к более быстрому старению культуры;

3) максимальная величина биомассы хлореллы отмечена при ее выращивании на питательных средах *Chlorella medium* (среда №4) и ВГ–11 (среда №5), однако, максимальное содержание каротиноидов, хлорофиллов *a* и *b* отмечено при культивировании на питательных средах модифицированная среда Тамийя (среда №1) и удобрение “Kristallon” (среда №2);

4) наиболее оптимальное физиологическое состояние на основе показателя желто–зеленого индекса отмечено при использовании для культивирования хлореллы питательных сред Тамийя: модифицированной (среда №3) и стандартной (среда №1) и интенсивности продувки 40–45 л/ч («продувка №2»).

Таким образом, лучшими условиями культивирования хлореллы, обеспечивающими быстрый рост и оптимальное содержание фотосинтетических пигментов, являются: интенсивность продувки – 60–65 л/ч, а для накопления биомассы – питательные среды *Chlorella medium* и ВГ–11. Питательные среды Тамийя стандартная и Тамийя модифицированная обеспечивают оптимальное содержание фотосинтетических пигментов, в том числе и каротиноидов. Исходя из этого, при культивировании хлореллы необходимо создавать условия для первоначального накопления биомассы и для последующего усиленного синтеза пигментов, т.е. целесообразно разделение процесса культивирования хлореллы на два этапа для увеличения производительности на каждом из них.

Литература

1. Георгицина, К.А. Водоросли – продуценты биоорганических соединений / К.А. Георгицина // PontusEuxinus 2011: тезисы VII Междунар. науч.–практ. конф. по проблемам водных экосистем, посвящённой 140–летию Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины, Севастополь, 24–27 мая 2011 г. / ЭКОСИ–Гидрофизика, 2011. – С. 66–67.
2. Мельников, С.С. Оптимизация условий выращивания хлореллы / С.С. Мельников [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер.біял. навук. – 2014. – №3. – С. 52–56.
3. Kozlov, A. Influence of the fulfilled beer yeast on the level of benthos in maturing ponds at the beginning of piscicultural season / A. Kozlov // Pond Aquaculture in Central and Eastern Europe in the 21st Century: Handbook of abstracts. – Vodnany, Czech Repub, May 2–4. – 2001. – P. 16.
4. Джулай, А.А. Содержание хлорофилла *a* и поглощение света фитопланктоном в Севастопольской бухте (2009–2010 гг.) / А.А. Джулай // Pontus Euxinus 2011: тезисы VII Междунар. науч.–

практ. конф. по проблемам водных экосистем, посвящённой 140-летию Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины, Севастополь, 24–27 мая 2011 г. / ЭКОСИ–Гидрофизика, 2011. – С. 97–98.

5. Hosikian, A. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects / A. Hosikian, S. Lim, R. Halim, M. K. Danquah // International journal of chemical engineering. – 2010. – P. 1–11.

6. Догадина, Т.В. Десмидиевые водоросли сточных вод / Т.В. Догадина // Науч. докл. высшей школы. Сер. Биол. науки. – 1972 б. – № 7. – С. 76–81.

7. Елизарова, В.А. Содержание фотосинтетических пигментов в фитопланктоне водоёмов разного типа: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.18 / В.А. Елизарова; Институт биологии внутренних вод АН СССР. – Москва, 1975. – 24 с.

8. Минаев, О.В. Выращивание двухлеток судака в условиях карповых хозяйств II зоны рыбодводства / О.В. Минаев // Молодёжь в науке – 2011: материалы Междунар. науч. конф. молодых учёных, Минск, 25–29 апреля 2011 г. / Нац. акад. наук Беларуси. Совет молодых учёных НАН Беларуси; редкол. В.Г. Гусаков (гл. ред.), И.М. Богдевич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 106–112.

9. Бульон, В.В. Соотношение между первичной продукцией и рыбопродуктивностью водоёмов / В.В. Бульон, Г.Г. Винберг // Основы изучения водных экосистем. – Л., 1981. – С. 5–10.

10. Дмитриевич, Н.П. Влияние физиологического состояния микроводорослей на соотношение в их клетках различных пигментов / Н.П. Дмитриевич, Т.В. Козлова // Вестн. Полес. гос. ун-та. Сер. прир. наук. – 2015. – № 1. – С. 40–43.

11. Некоммерческое учреждение: Научно-исследовательский институт альгобиотехнологии [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://chlorella-v.narod.ru/>. –Дата доступа: 15.03.2016.

12. Дмитриевич, Н.П. Влияние питательной среды и интенсивности барботаж на динамику биомассы хлореллы / Н.П. Дмитриевич, А.С. Крыльчук, Н.А. Симончик // Научный потенциал молодёжи – будущему Беларуси : материалы X междунар. молодёжн. науч.-практ. конф., Пинск, 15 апр. 2016 г. / Полес. гос. ун-т ; ред.: К. К. Шебеко [и др.]. – Пинск, 2016. – Ч. 1. – С. 474–476.

13. Гайсина, Л.А., Современные методы выделения и культивирования водорослей: учеб. пособие / Л.А. Гайсина, А.И. Фазлутдинова, Р.Р. Кабиров. – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 52 с.

14. Belcher, H. Culturing algae: A guide for schools and colleges / H. Belcher, E. Swale. – Cambridge : Titus Wilson & Son Ltd, 1988. – 28 p.

15. Kusumaningrum, H.P. Application of aquaculture natural food produce by protoplast fusion process of *Dunaliella salina* and *Phaffiarhodomyces* / H.P. Kusumaningrum, M. Zainuri, Hersugondo // Journal Ilmu Kelautan. – 2010. – Vol. 15 (4). – P. 236–242.

16. SCOR–UNESCO. Determination of photosynthetic pigments in sea-water // Monographs on oceanographic methodology. – Paris. – 1966. – P. 9–19.

INFLUENCE OF MEDIUM AND SPARGING INTENSITY ON THE DYNAMICS OF GROWTH PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF CHLORELLA

N.P. DMITROVICH, A.S. KRYLCHYK, N.A. SIMONCHYK

Summary

Finding the optimal blowing regime and culture media to ensure rapid growth and supporting an optimal physiological state by using chlorella in its line-up of cheap reagents, is highly relevant. According to the results of the study, identified the best culture conditions for chlorella. For the accumulation of biomass should use culture media №4 and №5 and blowing intensity – 60–65 l / h. For optimum content of photosynthetic pigments, including carotenoids, growth media recommended №2 №1 and blowing intensity – 60–65 l / h too. During cultivation of chlorella it is necessary to create conditions for the biomass accumulation and subsequent enhanced synthesis of pigments.

Статья поступила 19 сентября 2016г.