

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

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 p (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 барботажа 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.*