

МИКСОТРОФНЫЙ РОСТ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* НА НЕОРГАНИЧЕСКОЙ СРЕДЕ С ГЛЮКОЗОЙ И ГЛИЦЕРИНОМ В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Я. Д. Жондарева

Институт морских биологических исследований им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, РФ,
yana.zhondareva@yandex.ru

Исследованы ростовые и продукционные характеристики *Phaeodactylum tricornutum* при накопительном культивировании на минеральной среде и с импульсной подачей органических источников углерода и энергии на стационарной фазе роста. Выявлено, что при первом внесении энергетического и углеродного субстрата в виде глицерина в 1,75 раз увеличивается линейная скорость роста, приводя к достижению культурой максимальной плотности 5 г АСВ/л, что в 1,7 раза выше фотоавтотрофного роста.

Ключевые слова: *Phaeodactylum tricornutum*, накопительное культивирование, углерод, энергетический субстрат, максимальная плотность и продуктивность

В промышленных странах увеличивается спрос на использование микроводорослей в качестве пищевых и кормовых добавок, так как они являются ценным источником полиненасыщенных жирных кислот, незаменимых аминокислот, пигментов [1].

Микроводоросли преимущественно культивируют фотоавтотрофно. Основным недостатком фотоавтотрофного способа выращивания является низкая максимальная продуктивность культуры, так как при увеличении плотности происходит самозатенение клеток и наступает лимит света, доступного для роста фототрофов.

Присутствие источников энергии и углерода имеет существенное значение для скорости деления клеток, тем самым определяя оптимальный рост популяции микроводорослей. Многие микроводоросли обладают способностью переходить на миксотрофный тип питания, т. е. на использование энергии света совместно с метаболизацией поступающих в среду экзогенных органических веществ [2]. В литературе встречается много работ, посвященных исследованию миксотрофного питания низших фотоавтотрофов, однако нет объяснения, почему используются те или иные концентрации органического субстрата.

Цель работы состояла в оценке влияния органических источников углерода и энергии на примере глюкозы и глицерина на рост *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin как представителя большинства видов морских микроводорослей, являющихся ценным источником эйкозопентаеновой кислоты.

Материал и методы. В эксперименте использовалась альгологически чистая культура морской диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin из коллекции культур микроводорослей музея ИМБИ им. А. О. Ковалевского.

Культивирование осуществляли в накопительном режиме на питательной среде, разработанной для данного вида водорослей [3], в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа объемом 1 л с толщиной слоя культуры 2 см. [4]. Для поддержания этого объема и компенсации испарения на протяжении всего эксперимента перед отбором проб для проведения измерений доливали дистиллированную воду до отметки 1 л. Температуру стабилизировали на уровне 17–20 °С. Эксперимент проводили в условиях непрерывного освещения. Интенсивность освещения на поверхности культуры регистрировали однократно при помощи люксметра Ю-116, с погрешностью не более

5 % от измеряемой величины. Средняя освещённость 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 глюкозу и глицерин в концентрации, рассчитанной исходя из потребностей микроводорослей в углероде [5].

В процессе культивирования осуществляли ежесуточный контроль прироста культуры микроводорослей, на основании которого построены графики, отображающие рост *Phaeodactylum tricornutum*. 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 с помощью центрифуги и прямого взвешивания на аналитических весах.

Плотность культуры (абсолютно сухой вес) вычисляли, используя коэффициент перехода от оптической плотности [6]:

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

Аппроксимированием экспоненциальной и линейной фаз роста определяли удельную скорость роста (μ) и максимальную продуктивность (P_m) культуры микроводорослей [3]:

$$B = B_0 \times e^{\mu t}, \quad (2)$$

$$B = P_m \times t + B_0, \quad (3)$$

где B – биомасса, г·сут⁻¹; t – время, сут.; B_0 – биомасса в начале экспоненциальной и линейной фазы роста соответственно т. е. при $t = t_0$.

Результаты и обсуждение. Экспериментальная работа была проведена в трех вариантах. Во всех трех опытах микроводоросли вначале культивировали в одинаковых условиях с подачей 2% углерода посредством барботирования культуры воздухом. При этом получили одинаковый экспоненциальный, линейный рост и максимальную плотность культуры, что продемонстрировано на рис. 1.

Максимальная плотность культуры составила 3 г АСВ/л, удельная скорость роста во всех трех вариантах эксперимента была равной 0,8 сут⁻¹, а максимальная продуктивность – 0,4 г АСВ / (л·сут).

Таким образом, результаты этого опыта подтвердили два предположения:

- 1) линейный рост микроводорослей зависит от углеродного обеспечения клеток [7];
- 2) при достижении культурой стационарной фазы роста с максимальной плотностью наблюдается световой компенсационный пункт фотосинтеза.

Литературные данные [2] и собственные экспериментальные исследования [8] показали, что фотосинтезирующие организмы способны усваивать органический источник углерода и энергии.

Поэтому на основании расчета потребностей микроводорослей в углероде на стационарной фазе роста внесли глюкозу в количестве 11,19 г/л и глицерин – 5,575 г/л. Такое количество органических веществ обеспечивало концентрацию около 2 г/л углерода. Вместе с этим глюкоза и глицерин обеспечивали около 45 и 35 ккал/л соответственно энергетического субстрата. Результаты иллюстрируются рис. 2 и 3.

Опыт показал, что для перехода на миксотрофный тип питания клетки низших фототрофов должны сначала адаптироваться к новым для них условиям, и время адаптации в обоих вариантах составило 4 суток, что хорошо согласуется с нашими предварительными исследованиями [8].

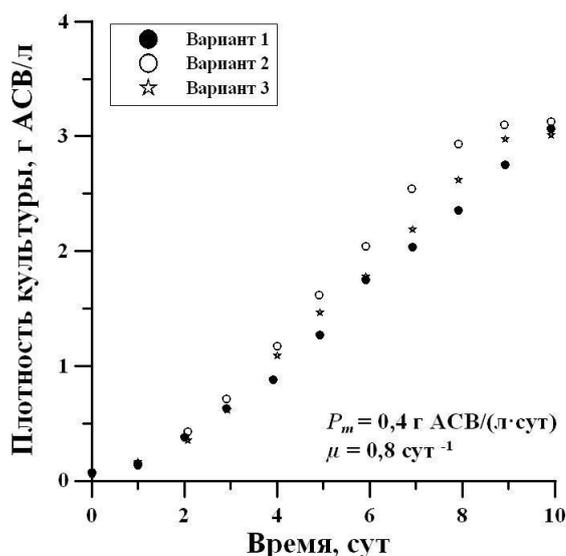


Рис. 1 Динамика плотности культуры *P. tricornutum* при культивировании на минеральной среде

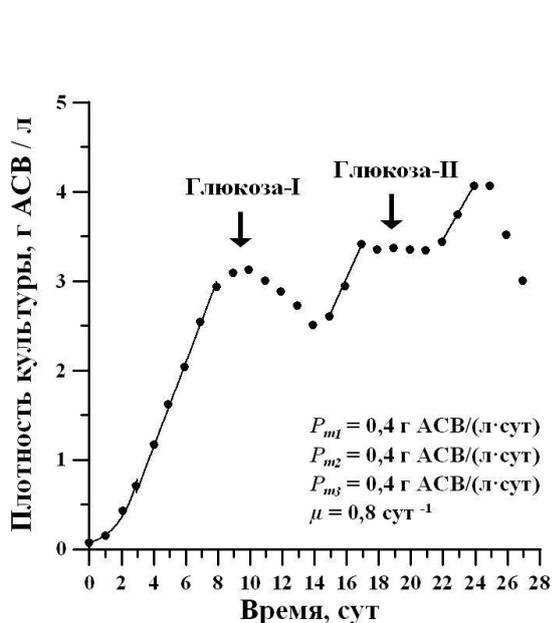


Рис. 2 Динамика плотности культуры *P. tricornutum* с импульсной подачей глюкозы. Стрелками указан переход на использование органического источника углерода и энергии

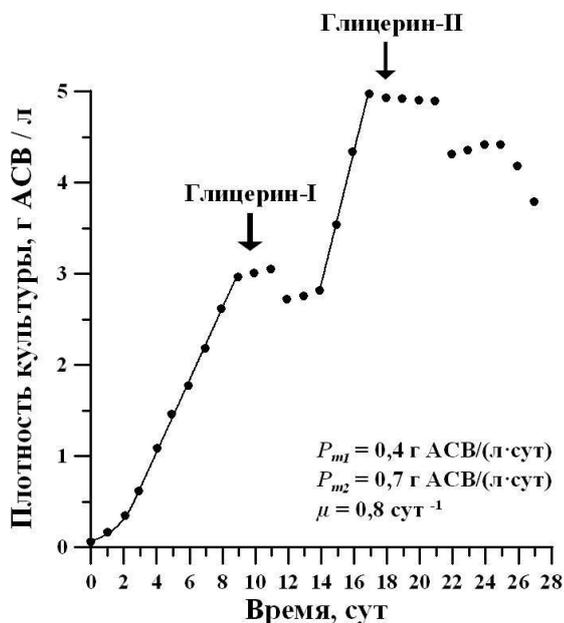


Рис. 3 Динамика плотности культуры *P. tricornutum* с импульсной подачей глицерина. Переход на использование органического источника углерода и энергии указан стрелками

В результате при первом добавлении глюкозы культура незначительно выросла до максимальной плотности 3,5 г АСВ/л. Второе добавление глюкозы той же концентрации на 17-е сутки эксперимента дало максимальный выход биомассы микроводорослей, равный 4 г АСВ/л. При этом в обоих случаях линейная скорость роста не изменилась, и максимальная продуктивность была идентичной первоначальной, составив 0,4 г АСВ/(л·сут) (рис. 2). Таким образом, культура выросла с 3 до 4 г АСВ/л.

Импульсная подача источника углерода и энергии в виде глицерина привела к получению максимальной плотности культуры микроводорослей, которая составила 5 г АСВ/л. Следует отметить, что по сравнению с результатами опыта с глюкозой и перво-

начальным значением максимальной продуктивности величина последней была в 1,75 раз выше, составив 0,7 г АСВ/(л·сут) (рис. 3). Второе внесение на стационарной фазе в культуру той же концентрации глицерина не привело к дальнейшему росту, что согласуется с литературными данными [8]: при наличии в питательной среде глицерина в количестве более 100 ммоль рост низших фототрофов ингибируется.

Таким образом, из рис. 2 и 3 видно, что с добавлением глюкозы и глицерина как источников углерода и энергии начинался линейный рост, указывая на то, что фототрофы начали использовать органический углерод для роста.

Заключение. Полученные результаты показали, что рост микроводорослей после стационарной фазы напрямую зависит от обеспечения клеток углеродом и энергией. При достижении максимальной плотности культуры клеток наблюдается как углекислотный, так и световой компенсационный пункт. Экспериментально показано, что наилучшим углеродным и энергетическим субстратом является глицерин, приводя к увеличению максимальной плотности культуры до 5 г АСВ/л, что в 1,7 раз выше по сравнению с фотоавтотрофным ростом. Таким образом, посредством добавления в среду источников углерода органического происхождения можно потенциально улучшить рост фотосинтезирующих организмов и увеличить их продуктивность.

1. Borowitzka M. A., Borowitzka L. J. / Vitamins and fine chemicals from microalgae // Microalgal biotechnology. 1988. P.153–196.
2. Ceron Garcia, M. C., F. Gacia Camacho, A. Sancheth Miron, J. M. Fernandez Sevilla, Y. Chisti, and E. Molina Grima. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. J. Microbiol. Biotechnol. 16(5), 2006, pp. 689–694.
3. Тренкеншу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: автореф. дисс. канд. биол. наук.: спец. 03.00.02 «Биофизика» / Р. П. Тренкеншу – Красноярск, 1984. – 28 с.
4. Тренкеншу Р. П., Боровков А. Б., Лелеков А. С. Унифицированная лабораторная установка для исследования низших фототрофов. Севастополь: Изд-во ИнБИОМ НАНУ, 2009, 40 с.
5. 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, 16: 287–297.
6. Боровков А. Б., Геворгиз Р. Г. Продуктивность *Spirulina platensis* и *Tetraselmis viridis* при использовании различных методов культивирования. Экология моря. Вып. 70, 2005, с. 9–13.
7. Лелеков А. С., Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста. 4. Экспоненциальная и линейная фазы роста. Экология моря. Вып. 74, 2007, с. 4749.
8. Жондарева Я. Д., Тренкеншу Р. П. Фотоавтотрофный и миксотрофный рост *Tetraselmis viridis* в накопительной культуре // Актуальные вопросы биологической физики и химии: материалы XI Междунар. конф. (Севастополь, 27–29 апреля 2016 г.). Севастополь, 2016. Т. 2. с. 106–109.

MIXOTROPHIC GROWTH OF *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* IN INORGANIC MEDIUM WITH GLUCOSE AND GLYCEROL IN BATCH CULTURE

Ya. D. Zhondareva

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS, Sevastopol, RF, yana.zhondareva@yandex.ru

The growth and production characteristics of *Phaeodactylum tricornutum* in batch culture on mineral medium with pulsed feeding of organic carbon sources and energy on the stationary growth phase has been studied. It was detected that in the first introduction of energy and the carbon substrate in the form of glycerol linear growth rate was increased 1.75 times, leading to the achievement of the maximum density of 5 g DCW / l. It was 1.7 times higher than under photoautotrophic growth.

Key words: *Phaeodactylum tricornutum*, batch culture, carbon, energy substrate, maximum density and productivity