Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

УДК 574.55, 57.084.1, 561.263

Подбор и оптимизация среды для выращивания биотехнологически значимых культур водорослей на примере *Chlorococcum* sp.

Алёхина Г.П., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В.

Оренбургский государственный университет

Аннотация

Рассматривается влияние некоторых абиотических факторов на выращивание биотехнологически значимых культур водорослей на примере Chlorococcum sp. с подбором оптимальной питательной среды, её модификацией с целью наибольшего прироста биомассы микроводорослей и удешевлением процесса их выращивания. В ходе эксперимента была модифицирована среда для культивирования водорослей, которая имела отличия в параметрах от классической среды Прата, дающая более интенсивный рост водоросли и экономические преимущества выращивания Chlorococcum sp.

Ключевые слова: ЗЕЛЁНЫЕ ВОДОРОСЛИ, ПРОДУКТИВНОСТЬ, *CHLOROCOCCUM SP.*, СРЕДА ПРАТА

Введение

Известно, что целый ряд водорослей представляет особую научную и хозяйственную ценность. Среди водорослей имеется ряд представителей, которые на протяжении многих лет служат объектом промышленной биотехнологии. Биомасса водорослей содержит более 350 индивидуальных соединений, многие из которых являются биологически активными – это витамины, аминокислоты, фенольные соединения, цитокинины, ауксины, стерины, полиненасыщенные жирные кислоты [1]. Среди этих веществ есть также соединения, обладающие бактерицидной активностью, что позволяет при использовании водорослей в качестве кормовой добавки для животных снизить использование ветеринарных препаратов [2].

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

Биотехнологическое производство водорослей, а также их культивирование в лабораториях происходит в искусственно созданных условиях на специальных питательных средах, которые имеют высокую стоимость, что связано с большими затратами на их выращивание и создание биомассы [3].

Поэтому основным путем снижения указанных выше затрат на производство биомассы водорослей является оптимизация питательных сред с целью уменьшения расходов. Следует отметить, что питательные среды, широко используемые в настоящее время для культивирования водорослей, дорогостоящие.

Снижение затрат на выращивание биомассы водорослей можно достичь подбором оптимального состава специальной питательной среды или её модификации. Это требует проведения исследований, направленных на поиск среды такого состава, который бы удовлетворял требованиям экономической эффективности и позволял выращивать большую биомассу водорослей.

Поэтому тема нашего исследования, посвященного поиску подходящей среды для выращивания образца *Chlorococcum* sp. с целью получения наибольшего количества биомассы при наименьших материальных затратах, весьма актуальна и своевременна. Интерес к данной водоросли связан с ее способностью к гиперсинтезу насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и возможностью использования в качестве перспективного объекта для производства биотоплива.

Материалы и методы

Материалом для работы послужила культура галотолерантной зеленой водоросли *Chlorococcum* sp. (рис. 1), предоставленная Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Оренбургским федеральным исследовательским центром Уральского отделения Российской академии наук (ОФИЦ УрО РАН).

Хлорококковые водоросли довольно многочисленный и разнообразный порядок зеленых водорослей, насчитывающий свыше 1200 видов.

Преобладающее большинство видов являются хлорофилл содержащими организмами и имеют зеленую окраску. В основном это микроскопические формы, размеры которых колеблются от 0,5 до 100 мкм, обычно 5–20 мкм.

Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
==========

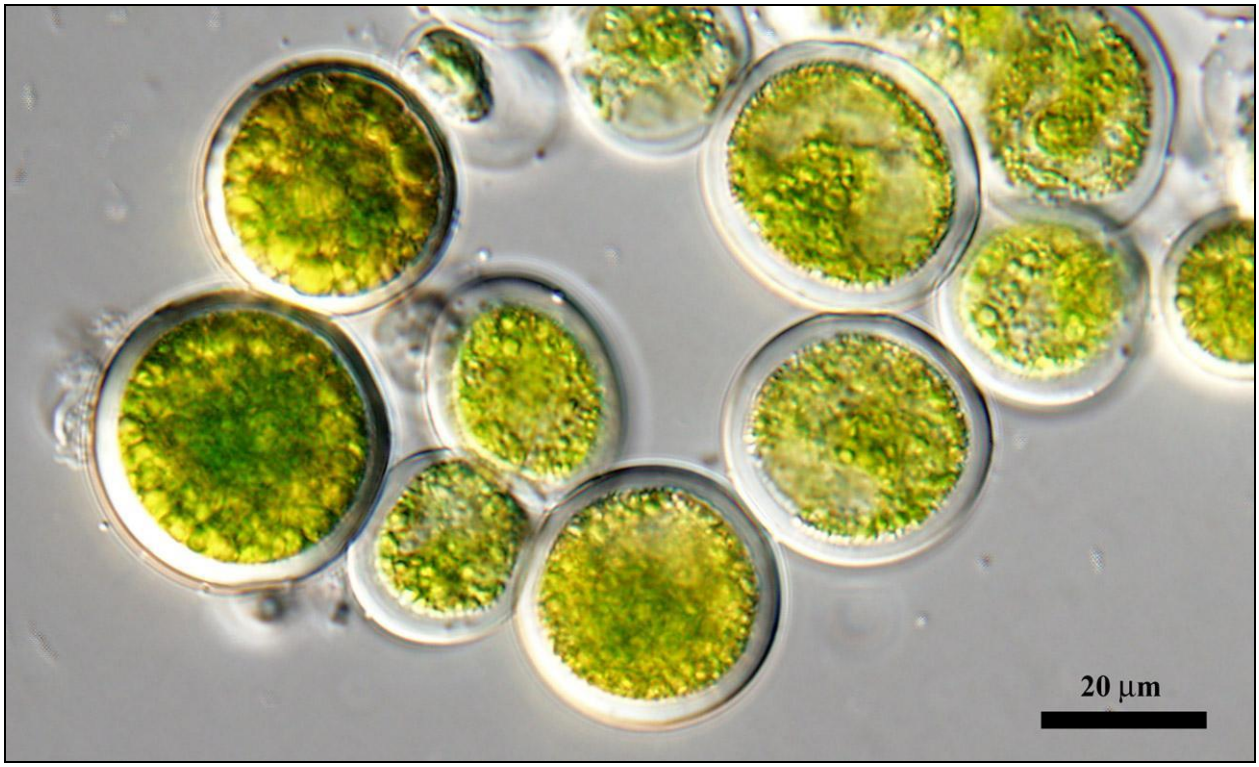

Рис. 1. Водоросль *Chlorococcum* sp.

К хлорококковым водорослям относятся одноклеточные, колониальные или ценобиальные, неподвижные в вегетативной фазе жизненного цикла, индивиды коккоидной структуры (как исключение, отдельные из них обладают сократительными вакуолями или стигмой), снабженные прочной целлюлозной или целлюлозо-спорополлениновой оболочкой, объединяющие моно- и ценоцитные формы. Одноклеточные формы образуют иногда скопления в виде однослойных пластинок или бесформенных конгломератов [4].

Хлорококковые водоросли играют большую роль в природе как продуценты органического вещества и кислорода. Они принимают активное участие в процессах самоочищения и формирования качества воды, а некоторые из них служат биоиндикаторами трофности и сапробности водоемов.

Хозяйственное значение многих видов хлорококковых определяется тем, что их поедают различные беспозвоночные и рыбы. Отдельные виды хлорококковых культивируют и используют в качестве стимулирующих кормовых и пищевых добавок, а также применяют в медицинской, парфюмерной и других отраслях промышленности [5].

В нашем исследовании для подбора оптимальной среды культивирования мы

использовали четыре стандартные среды, которые были выбраны исходя из потребностей роста исследуемого образца. Методика приготовления питательных сред представлена в таблице 1.

Таблица 1. Адаптированные питательные среды, используемые для лабораторного культивирования *Chlorococcum* sp.

Компоненты среды, г/л	Артари М	Кнопа	Прата	Тамия
$Ca(NO_3)_2$		0,025		
$MgSO_4*7H_2O$	5,0	0,06	0,01	2,5
KNO_3	2,5		0,10	5,0
KH_2PO_4		0,06		1,25
K_2HPO_4	0,2		0,01	
KCl		0,08		
Fe_2Cl_6		следы		
$FeCl_3$			следы	
$FeSO_4*7H_2O$				0,003
$NaHCO_3$	1,0			
NaCl	14,0	14,0	14,0	14,0
ЭДТА				0,037
pH	7,8	7,6–7,7	6,86	6,76

К 100 мл питательной среды инокулировали 4 мл культуры водорослей. Инкубировали в условиях люминостата при t=23–24 °С и световом режиме – день : ночь (16 : 8).

Для изучения влияния абиотических факторов на выращивание культур водорослей на примере *Chlorococcum* sp., нами были использованы следующие факторы:

1) pH среды (для снижения pH до 4–4,5 единиц использовали 1М HCl, для повышения pH до 9–9,5 – 1М NaOH);

2) концентрация NaCl в среде (14–100 г/л);

3) разведение среды (от 1:1 до 1:10).

Оптическую плотность измеряли на приборе фотометр фотоэлектрический КФК–3, при λ=750 нм на 0, 3, 6, 10, 14, 17, 21 сутки. Данные, полученные в результате экспериментальных исследований, были подвергнуты статистической обработке. При этом рассчитывали среднюю арифметическую ряда (М) по формуле (1):

$$M=\frac{\sum x_i}{n}, \qquad (1)$$

где x_i – значения отдельных вариант;

n – объем выборки [6].

Результаты исследований

На первом этапе было необходимо осуществить подбор оптимальной среды для культивирования водорослей с максимальным количеством биомассы.

Исследования микроводоросли *Chlorococcum* sp. показали ее преимущества, а точнее быстрый рост и хорошую экологическую адаптивность. Рост с высокой плотностью также может являться одним из преимуществ, которые могут обеспечить эффективное производство полезных биохимических веществ в открытых или закрытых системах культивирования.

На рис. 2 показана обобщенная динамика роста культуры Chlorococcum sp. на разных питательных средах, используемых для лабораторного культивирования водорослей.

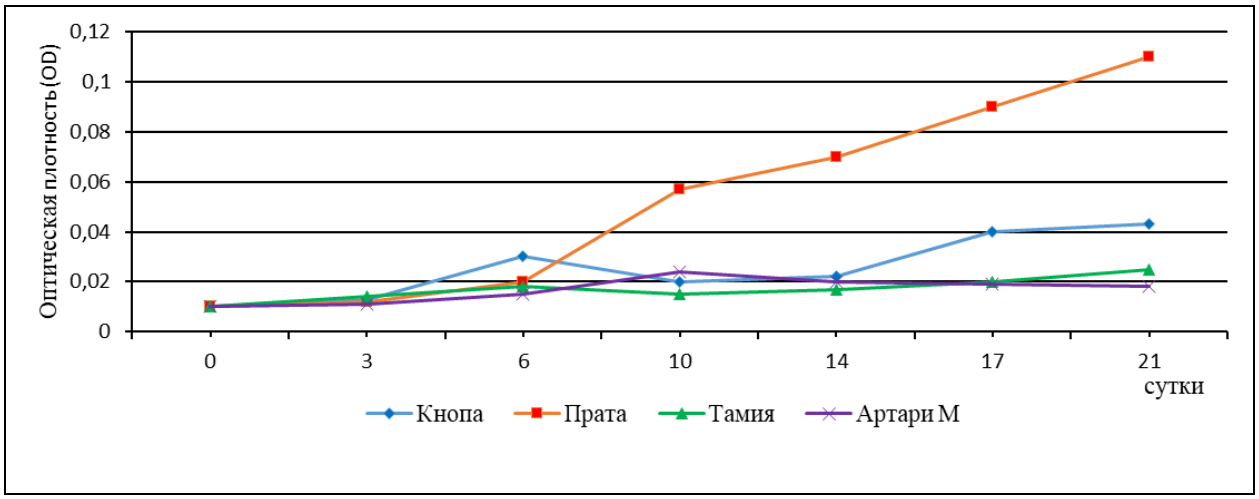

Рис. 2. Динамика роста культуры *Chlorococcum* sp. на разных питательных средах, используемых для лабораторного культивирования водорослей

Таким образом, сравнительный анализ данных, полученных в ходе культивирования штамма Chlorococcum sp. на различных питательных средах показал, что наибольший прирост биомассы наблюдается на среде Прата, адаптированной для лабораторного культивирования.

На втором этапе эксперимента для изучения влияния абиотических факторов на

выращивание биотехнологически значимых культур водорослей на примере *Chlorococcum* sp была использована среда Прата.

Вначале была исследована возможность использования разведений среды Прата для культивирования *Chlorococcum* sp. с целью удешевления процесса. Использовали следующие разведения: 1:1 (исходная среда); 1:2; 1:5; 1:10.

Для сравнительной оценки воздействия различных концентраций питательной среды использовали величину оптической плотности при культивировании водорослей (рис. 3).

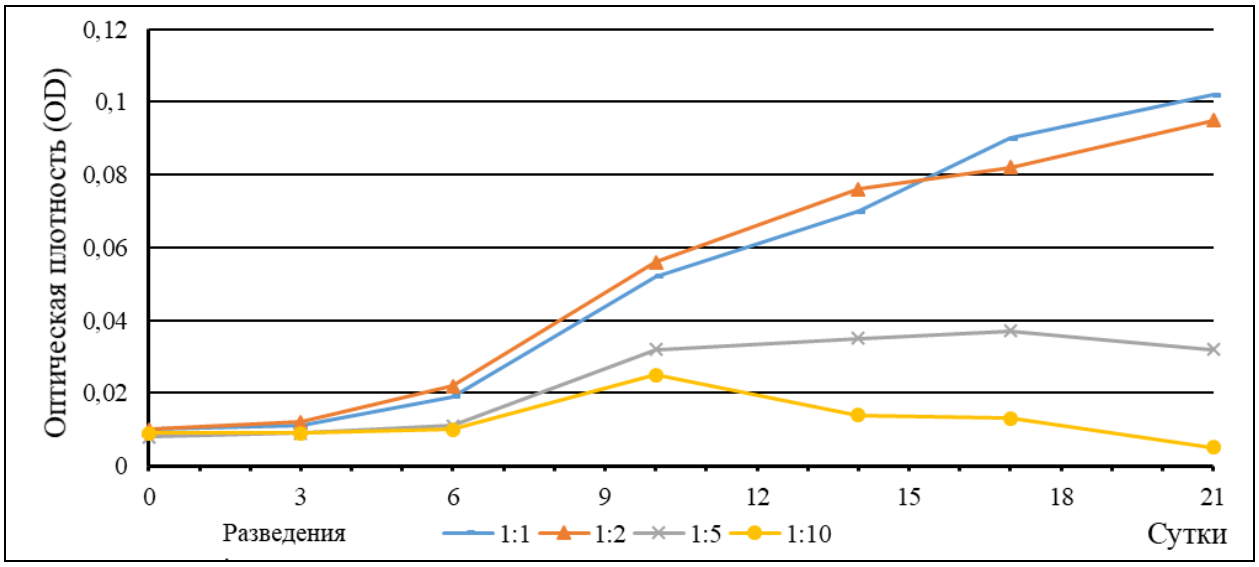

Рис. 3. Динамика роста культуры *Chlorococcum* sp. на питательной среде Прата, используемой для лабораторного культивирования водорослей в разных разведениях

Неразведенная среда характеризовалась тем, что в период с 1 по 3 сутки наблюдалась лаг–фаза, что указывает на адаптацию клеток к новым условиям. В период с 3 по 6 сутки наблюдалась фаза ускорения, а в период с 6 по 10 сутки – экспоненциальная фаза. Период с 10 по 21 сутки отличается стабильным постоянным ростом популяции *Chlorococcum* sp.

При разведении среды Прата 1:2 не наблюдали значимых различий между показателями накопления биомассы водорослей по сравнению с неразведенной средой.

В то же время большие разведения среды (1:5 и 1:10) оказывали отрицательное влияние на накопление биомассы. В период фазы ускорения и экспоненциальной фазы оптическая плотность среды на 10,1–52,2 % была ниже, чем в неразведенной среде. В

период с 10 по 21 сутки оптическая плотность среды в разведении 1:5 и 1:10 значительно уменьшалась.

Далее было исследовано влияние концентраций 14 г/л, 25 г/л, 50 г/л и 100 г/л NaCl на развитие популяции *Chlorococcum* sp. Концентрация 14 г/л и 25 г/л не имели достоверных отличий между собой при определении оптической плотности (рис. 4).

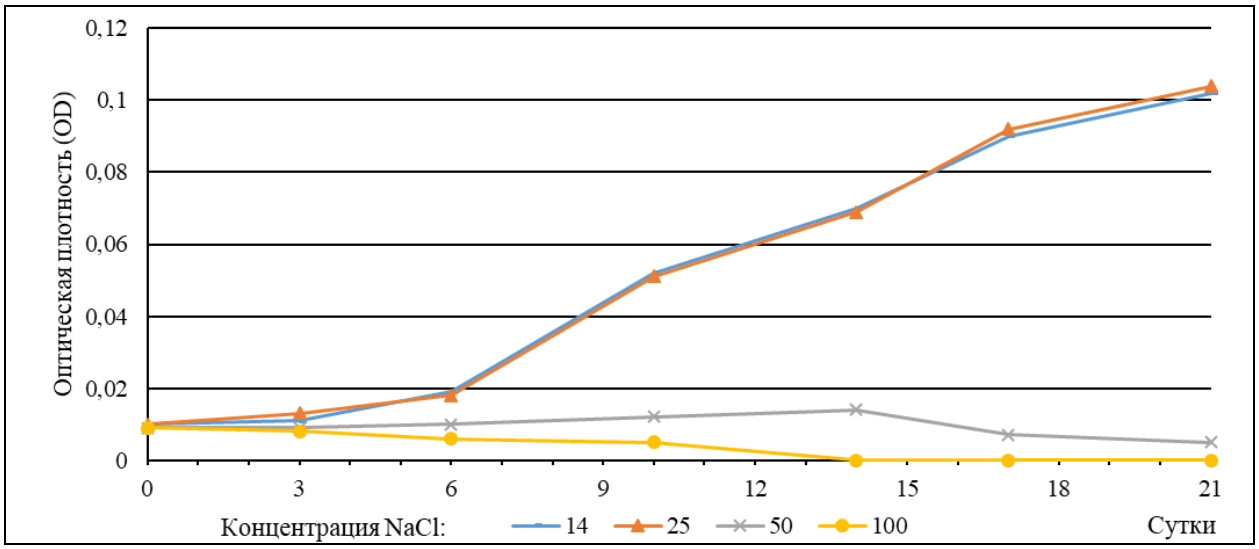

Рис. 4. Динамика роста культуры *Chlorococcum* sp. на питательной среде Прата, используемой для лабораторного культивирования водорослей при различной солености среды

Оптическая плотность среды, измеренная при внесении высоких концентраций соли NaCl (50 г/л и 100 г/л) в среде показала тенденцию к уменьшению к концу эксперимента. При этом уже на 6–10 сутки отмечали резкое снижение накопления биомассы водорослей.

На рис. 5 приведены результаты исследования влияния разных значениях pH на динамику роста культуры *Chlorococcum* sp. на питательной среде Прата, используемой для лабораторного культивирования водорослей.

Было показано, что оптимальный диапазон концентрации pH составил от 6 до 7 единиц, что совпадает с pH среды Прата (6,86 единиц). Отклонения от этих значений pH в большую или меньшую сторону вели к выраженному уменьшению накопления биомассы водорослей.

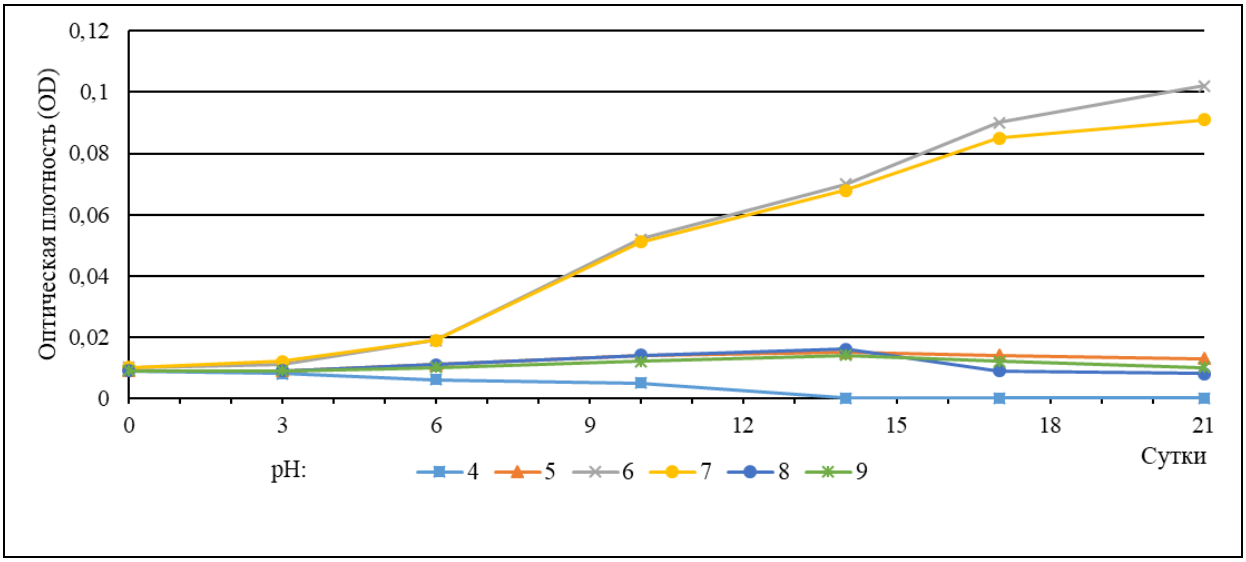

Рис. 5. Динамика роста культуры *Chlorococcum* sp. на питательной среде Прата, используемой для лабораторного культивирования водорослей при разных значениях pH

После изучения в эксперименте влияния абиотических факторов на накопление биомассы культуры *Chlorococcum* sp. на питательной среде Прата были модифицированы параметры классической среды, которая имела следующие отличия (табл. 2).

Таблица 2. Некоторые параметры классической и модифицированной среды для культивирования водорослей.

Параметры	Классическая среда Прата	Модифицированная среда Прата
pH	6,86	6-7
NaCl	14,0 г/л	14,0 -25,0 г/л
разведение	1:1	1:2

Далее нами был проведен сравнительный анализ динамики роста культуры *Chlorococcum* sp. на классической и модифицированной питательной среде Прата, используемой для лабораторного культивирования водорослей (рис. 6).

Классическая среда характеризовалась тем, что в период с 1 по 3 сутки наблюдалась лаг–фаза, что указывает на адаптацию клеток к новым условиям. В период с 3 по 6 сутки наблюдалась фаза ускорения, а в период с 6 по 10 сутки – экспоненциальная фаза. Период с 10 по 21 сутки отличается стабильным постоянным ростом популяции *Chlorococcum* sp. Среда, которая была модифицирована нами, также не имела значимых отличий, однако в ней присутствовало разведение 1:2, что делает ее более экономически выгодной.

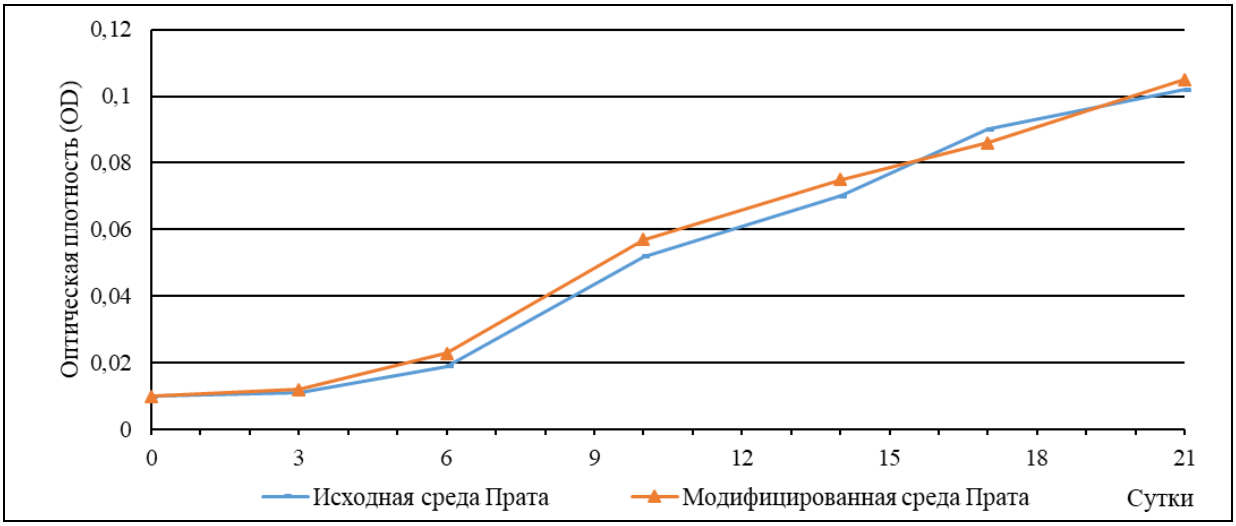

Рис. 6. Динамика роста культуры *Chlorococcum* sp. на классической и модифицированной питательной среде Прата

Таким образом, с помощью модификации питательной среды Прата может быть достигнуто снижение производственных затрат, так как предлагаемая нами среда дает аналогичный прирост биомассы водорослей при ее разведении 1:2.

Заключение

Текущий прогресс в биотехнологии водорослей обусловлен повышенным спросом на новые источники биомассы из-за глобальных проблем, новых научных открытий и доступных технологий, а также возросшей глобальной осведомленности общества о многочисленных применениях водорослей.

Сравнительный анализ данных, полученных в ходе эксперимента, показал, что штамм Chlorococcum sp. имеет наибольший прирост биомассы на среде Прата, адаптированной для лабораторного культивирования. Проведенные исследования позволили определить оптимальные значения некоторых абиотических факторов среды лабораторного культивирования водорослей для накопления биомассы культуры Chlorococcum sp. В ходе эксперимента была модифицирована среда для культивирования водорослей, которая имела отличные от классической среды Прата параметры, дающие более интенсивный рост и экономические преимущества выращивания Chlorococcum sp.

Таким образом, для использования *Chlorococcum* sp. в биотехнологии рекомендуется культивировать её на разбавленных средах. Кроме того, выше исследованные показатели влияют и на фотосинтетические способности водорослей,

протекающие неодинаково в различных абиотических условиях. Перспективным является разработка и выпуск, модифицированной нами среды, пригодной для выращивания водорослей и являющейся малозатратной в экономическом плане для получения как можно больше зеленой биомассы и продуцирования необходимых веществ и соединений.

Список использованных источников:

1 Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П., Паламарь-Мордвинцева Г.М., Ветрова З.И., Кордюм Е.Л. Водоросли. – Справочник. – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.

2 Водоросли: Цианобактерии, красные, зеленые и харовые водоросли: учеб.-метод. пособие / под общ. ред. А.Г. Паукова. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. — 204 с.

3. Iwamoto H. Industrial production of microalgal cell–mass and secondary products major industrial species Chlorella // Handbook of microalgal culture. - Oxford: Blackwell. – 2004. – Vol. 15. – P. 255–263.

4. Tseng C.K., Lobban C.S., Wynne M.J. Commercial cultivation // The Biology of Seaweeds. - Oxford: Blackwell Scientific Publications. – 1981. – Vol. 74. – № 43. – P. 680–725.

5. Del Río E., García–Gómez E. Continuous culture methodology for the screening of microalgae for oil // Journal of Biotechnology. – 2015. – Vol. 195. – № 33. – P. 103–107.

6. Кочубей В.И. Определение концентрации веществ при помощи спектрофотомерии. – Саратов: 2008. – 14 с.

==========

Цитирование:

Алёхина Г.П., Верхошенцева Ю.П., Шамраев А.В., Хардикова С.В. Подбор и оптимизация среды для выращивания биотехнологически значимых культур водорослей на примере *Chlorococcum* sp. [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2022. – № 5. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2022/5/st_501.pdf. DOI: https://doi.org/10.51419/202125501.