

ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИРОЩУВАННЯ *ANABAENA HASSALII* (KUTZ.) WITTR. ЗА РІЗНИХ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ

Л. М. ЧЕБАН, І. В. МАЛІЩУК, В. Р. ЛИСАК, М. М. МАРЧЕНКО

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: larisa.cheban@mail.ru

*Робота присвячена оцінці ефективності культивування альгологічно чистої культури *Anabaena hassalii* (Kutz.) Witttr. на різних середовищах. Продуктивність культури аналізували за накопиченням білку та фотосинтезуючих пігментів (хлорофілу *a* та каротиноїдів). Досліджувану водорість вирощували на штучному середовищі Фітцджеральда № 11 в модифікації Цендера і Горхема та на воді із установок замкнутого водопостачання, стандартизований за показниками рН та загальної мінералізації. Ефективність культивування мікроводорості на скидній воді не відрізнялась від такої за умов використання штучного середовища. В процесі культивування на обох досліджуваних середовищах відмічене постійне збільшення біомаси, що сягала свого максимуму на 40 добу. Подібні тенденції встановлені і при вивченні динаміки вмісту загального білка та хлорофілу *a*. Максимальним вмістом білка, що знаходився в межах 22-23 %, культура *A. hassalii* характеризувалася на 40 добу вирощування. Також до 30 доби культивування включно спостерігалось поступове збільшення кількості хлорофілу *a*, що сягало рівня 17-21 мг/г сухої біомаси на обох середовищах культивування. Відмічене лінійне накопичення каротиноїдів в клітинах *A. hassalii* впродовж всього терміну культивування. Максимальний вміст каротиноїдів припадає на стаціонарну фазу росту культури *A. hassalii* на обох живильних середовищах. Культивування мікроводорості *A. hassalii* як на середовищі Фітцджеральда, так і на воді із рибоводної установки має подібні темпи росту та дозволяє отримати активно ростучу культуру, що характеризується постійним приростом біомаси, високим вмістом загального білка та основних фотосинтезуючих пігментів. Отриману таким чином продуктивну культуру можна використовувати для подальшої переробки чи продовжувати пасажувати на свіжому живильному середовищі.*

*Ключові слова: *Anabaena hassalii*, біомаса, хлорофіл *a*, каротиноїди, скидні води із рибоводної установки замкнутого водопостачання.*

Вступ. Перевагою біотехнологій є те, що при контрольованому культивуванні фотосинтезуючих мікроорганізмів практично немає втрат цінної біомаси, яку використовують як в нативному, так і в переробленому стані (Золотарьова, 2008). Важливим при цьому є нетоксичність отриманої альгомаси, що дозволяє застосовувати її в якості харчових та кормових добавок чи преміксів (Макарова, 2009).

Можливість всебічного використання мікроводоростей потребує активного скринінгу високопродуктивних штамів і оптимізацію умов їх культивування за показниками продуктивності альгокультур. Для встановлення ефективності культивування мікроводоростей визначають приріст біомаси, сумарний вміст білків та пігментів, які є строго видоспецифічною ознакою (Кардаш, 2010). Мінеральний склад живильного середовища і умови культивування змінюють співвідношення фотосинтетичних пігментів, фракційний склад білків та значно впливають на продуктивність мікроводоростей (Мушак, 2007).

Найважливішими елементами мінерального живлення альгокультур є неорганічний вуглець, різні форми азоту (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) та фосфор. В той же час, широкий діапазон адаптаційних можливостей мікроводоростей дозволяє використовувати для їх культивування комплексні живильні середовища та стічні води різного походження (Голуб, 2013, Макарова, 2009). В якості живильного середовища можна розглядати і скидні води із рибоводних установок, які збагачені біогенними елементами, зокрема різними формами азоту. Такий підхід дозволить значно зменшити витрати на живильні середовища і при цьому отримати біомасу мікроводоростей, збагачену цінними сполуками.

Метою даної роботи була оцінка ефективності вирощування альгологічно чистої культури *Anabaena hassalii* (Kutz.) Witttr. за умов застосування штучного поживного середовища та скидних вод із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ).

Матеріали та методи. Дослідження проводили з використанням альгологічно чистої

культури синьо-зеленої водорості *A. hassalii* (НРДР), отриманої з колекції Інституту гідробіології НАН України.

Мікродорість культивували в стерильних умовах на середовищі Фітцджеральда № 11 в модифікації Цендера і Горхема (Золотарьова, 2008) та на скидних водах із УЗВ. Воду автоклаували при температурі 121 °С протягом 30 хв та стандартизували за показниками рН (7,5 – 8) та загальної мінералізації (495±5 ppm). Культивування проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 500 мл при температурі 21 ± 2°С, освітленні люмінесцентними лампами близько 2500 лк та 16-ти годинному фотоперіоді (Гайсіна, 2008). Інокуляцію проводили у співвідношенні інокулят : живильне середовище - 1:10.

Кількість біомаси визначали за густиною культури з використанням оптичних показників при 450 та 750 нм (Гудвилович, 2005) на СФ-46. Перехід від одиниць оптичної густини (D_{750}) до величини абсолютно сухої біомаси (АСБ) здійснювали через емпіричний коефіцієнт k :

$$\text{АСБ} = k \times D_{750}.$$

Коефіцієнт k ($k = \text{г/л/од.опт.густини}$) для культури *A. hassalii* визначали експериментально у трьох незалежних повторях (Горбунова, 2010).

Суспензію мікродорості центрифугували при 8 тис. об./хв. протягом 15 хв на Biofuga stratos "Herauses". У оводнених клітинах визначали кількість білку (Біохімія гідробіонтів, 2009), хлорофілу a (Campbell, 1998) та сумарних каротиноїдів (Sanchez, 2008), отримані показники перераховували на абсолютну суху масу. Після центрифугування біомасу мікродоростей дезінтегрували на УЗДН-2Т. Пігменти екстрагували із клітин мікродорості 100 % ацетоном. Спектри екстрактів пігментів вимірювали спектрофотометрично на СФ-46 в діапазоні довжин хвиль 400 – 800 нм. Розрахунок концентрації пігментів проводили за формулами (Geffrey, 1975) за значеннями оптичної густини при довжинах хвиль, що відповідають максимумам поглинання хлорофілу a та сумарних каротиноїдів.

В процесі культивування контролювали фізико-хімічні показники: рН (іонометр U-160 MU) та загальну мінералізацію середовища (кондуктометр Water Quality Tester COM – 100).

Вміст у воді розчиненого кисню, амонію, нітритів, нітратів та фосфатів визначали за загальноприйнятими гідрохімічними методами (Методи, 2006).

Ефективність вирощування оцінювали в динаміці культивування на 5, 10 та наступні кожні 10 діб до 60-ої доби включно.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Microsoft Excel. Відмінності отриманих результатів, вірогідні при рівні значимості $p \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента.

Результати та обговорення. Одним із показників стану альгокультур є продуктивність фотосинтезу, яку можна оцінити за накопиченням первинної біомаси (Отуріна, 2010). Швидкість росту біомаси в першу чергу залежить від складу живильного середовища та умов культивування (інтенсивність освітлення, тривалість фотоперіоду, температура, тощо).

Наші дослідження засвідчили, що впродовж перших 5 діб вирощування *A. hassalii* на середовищі Фітцджеральда та на скидних водах з УЗВ, спостерігається низька ростова активність культури, що, очевидно, зумовлено адаптацією мікродорості до нових умов (рис.1А). З 10-ї доби культивування відмічено посилення ростових процесів в досліджуваній культурі. Найінтенсивніший ріст біомаси спостерігався у період з 10-ї до 40-ї доби культивування, на яку припадає максимальна продуктивність культури *A. hassalii*. Починаючи з 40-ї доби експерименту кількість біомаси монокультури *A. hassalii* починає знижуватися, оскільки альгокультура переходить у фазу відмирання, а її ріст лімітується зменшенням доступних живильних елементів та накопиченням продуктів метаболізму в культуральній рідині.

У експоненційній фазі паралельно з приростом біомаси активуються також процеси біосинтезу. На цьому етапі мікродорості практично не обмежені компонентами мінерального живлення, тому якісний та кількісний склад білка в клітинах характеризується найвищим вмістом (Мікродорості, 2007). Нами відзначене поступове збільшення вмісту білка (рис. 1В) в клітинах *A. hassalii* з 10-ї по 40-ву добу культивування, як на середовищі Фітцджеральда, так і на воді із УЗВ, що на 40 добу експерименту сягали максимальних значень. Крім того, постійний контроль фізико-хімічних показників стану культурального середовища дав можливість встановити оптимальну тривалість культивування *A. hassalii*, яка становить 40 діб. Саме за такий термін вдається отримати активно ростучу культуру, що характеризується максимальною кількістю біомаси (4-5 г/л) та вмістом білка у сухій масі на рівні 23 %. Отриману таким чином продуктивну культуру можна використовувати для подальшої переробки чи продовжувати пасажувати на свіжому живильному середовищі.

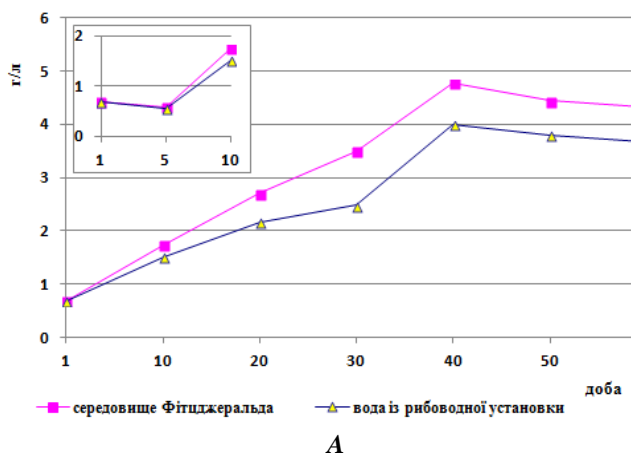


Рис. 1. Рівень біомаси (А) та кількість загального білка (В) в культурі *A. hassalii*

Продуктивність альгокультур оцінюють також за показниками накопичення фотосинтезуючих пігментів, зокрема хлорофілу *a*, який є єдиним типом хлорофілу у ціанобактерій. Залежність ефективності фотосинтезу від елементів мінерального живлення визначається їх необхідністю як для формування фотосинтетичного апарату, так і для його оновлення в процесі функціонування (Sanchez, 2008).

Зазвичай динаміка концентрації хлорофілу *a* в процесі культивування співпадає з динамікою збільшення концентрації клітин у культурі (Боровков, 2012). При культивуванні *A. hassalii* також спостерігали поступове збільшення кількості хлорофілу *a*, що сягали свого максимуму в стаціонарній фазі росту культури (рис. 2А). Так, кількість хлорофілу *a* в монокультурі *A. hassalii* під час інокуляції та проходження *lag*-фази майже не відрізнялась. Починаючи з 10-ї доби культивування

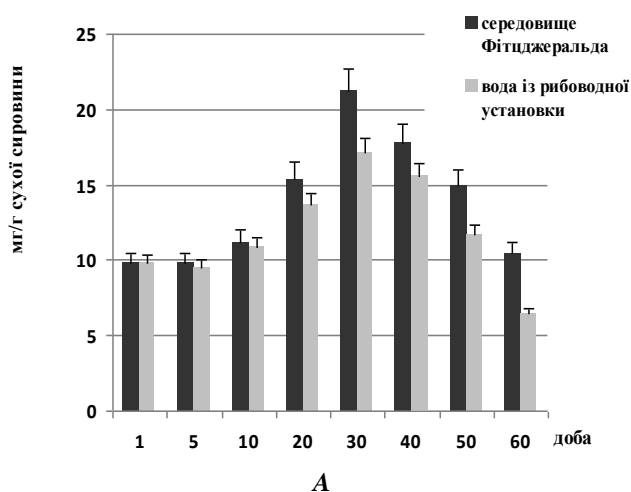


Рис. 2. Вміст хлорофілу *a* (А) та каротиноїдів (В) в культурі *A. hassalii*.

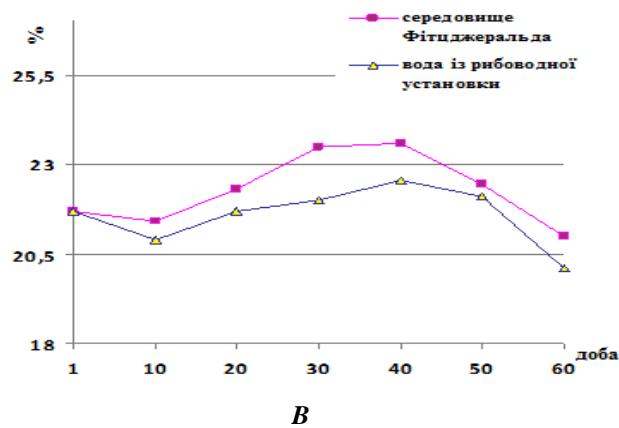


Fig 1. The level of the biomass (A) and protein content (B) in the culture of *A. hassalii*

спостерігалось поступове збільшення кількості пігменту. На 30 добу експерименту значення вмісту хлорофілу *a* в клітинах *A. hassalii* були максимальними, і сягали 21,2 мг/г сухої маси за умов культивування на середовищі Фітцджеральда та 17,2 мг/г сухої маси при вирощуванні на воді із УЗВ.

При подальшому культивуванні відмічене незначне зменшення кількості хлорофілу *a* на обох живильних середовищах. Таку динаміку пігментів в циклі росту альгокультури можна пояснити особливостями накопичувального культивування. Так, при тривалому культивуванні збільшення кількості клітин призводить до виснаження живильного середовища та дефіциту деяких мінеральних речовин. В той же час, спостерігається затінення культури мікроводоростей внаслідок її високої щільності, що поступово призводить до встановлених нами закономірностей розвитку монокультури *A. hassalii*.

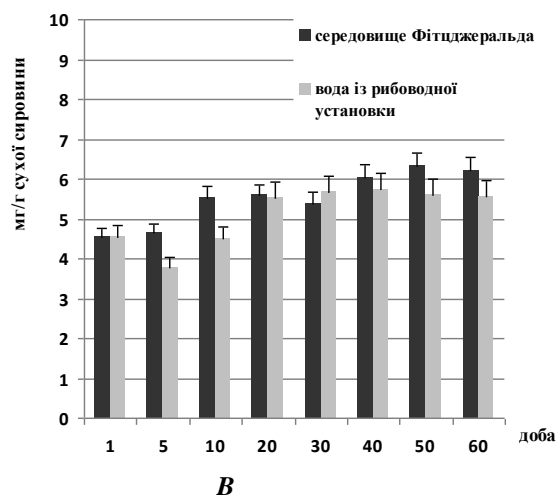


Fig. 2. The content of the chlorophyll (A) and carotenoids (B) in the culture of *A. hassalii*

Зміни кількості сумарних каротиноїдів відображають адаптивні властивості клітин мікроводоростей та здатність альгокультури пристосовуватись до умов культивування (Гудвиллович, 2005). Кількісний склад каротиноїдів в клітинах ціанобактерій може коливатися в залежності як від фази росту альгокультури, так і від кількості доступних біогенних елементів живильного середовища, зокрема азоту та фосфору (Комаристая, 2010). Так, нами відмічено, що максимальний вміст каротиноїдів припадає на стаціонарну фазу росту культури *A. hassalii* (рис. 2В). На 30 добу культивування цей показник сягав 6,23 мг/г сухої маси при застосуванні середовища Фітцджеральда і 5,58 мг/г сухої маси при вирощуванні *A. hassalii* на воді із УЗВ. При подальшому культивуванні кількість каротиноїдів в клітинах *A. hassalii* дещо збільшувалась, однак достовірно не відрізнялася від максимальних значень, встановлених на 30 добу культивування. При цьому динаміка накопичення каротиноїдів не корелювала із такою при визначенні кількості хлорофілу *a* та кількості біомаси. На відміну від двох останніх показників нами відмічене лінійне накопичення каротиноїдів в клітинах *A. hassalii* впродовж всього терміну культивування на обох живильних середовищах.

Отже, культивування *A. hassalii* на скидних водах із УЗВ дозволяє отримати активно ростучу культуру, що характеризується постійним приростом біомаси, високим вмістом загального білка та основних фотосинтезуючих пігментів. При цьому ефективність культивування на зворотній воді із УЗВ практично не відрізняється від такої за умови використання штучного середовища Фітцджеральда.

Застосування в якості живильного середовища скидних вод із рибоводної установки дасть можливість значно знизити собівартість біотехнології отримання альгомаси та при цьому дозволить звільнити скидні води рибоводних систем від біогенних елементів.

Список літератури

1. Біохімія гідробіонтів / Вогнівенко Л.П., Євтушенко М.Ю., Шевряков М.В. та ін. – Херсон: Олді-плюс, 2009. – 536 с.
2. Гайсина Л.А. Современные методы выделения и культивирования водоростей // Л.А. Гайсина, А.И. Фазлутдинова, Р.Р. Кабиро – Уфа: Изд-во БГПУ, 2008. – 152с.
3. Голуб Н.Б. Культивування мікроводоростей за використання відходів / Н.Б. Голуб // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2013. – №. 6/10 (66). – С. 4 – 9.
4. Горбунова С.Ю. Ростовые и ассимиляционные характеристики культуры *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. при различных концентрациях фосфора в питательной среде / С.Ю. Горбунова, А.Б. Боровков // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80. – С. 34 – 40.
5. Гудвиллович И.Н. Динамика суммарных каротиноидов и хлорофилла *a* в клетках *Dunaliella salina* в квазинепрерывной культуре / И.Н. Гудвиллович, Н.М. Берегова, А.Б. Боровков // Экология моря. – 2005. – Вып. 6. – С. 52 – 55.
6. Золотарьова О.К. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. / О.К. Золотарьова, Є.І. Шнекова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко / Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес., 2008. – 234с.
7. Кардаш О.В. Пігменти синьозелених водоростей та їх використання / О.В. Кардаш, А.В. Курейшевич, О.А. Васильченко / Проблеми екологічної біотехнології. – 2010. – № 2. – С. 16 – 29.
8. Комаристая В.П. Культивирование *Dunaliella salina* Teod. при субоптимальных концентрациях азота и фосфора и исключения их из среды / В.П. Комаристая, С.П. Антоненко, А.Н. Рудась // Альгология. – 2010. – Т.20, №1. – С. 42 – 55.
9. Макарова Е.И. Прикладные аспекты применения микроводоростей – обитателей водных экосистем / Е.И. Макарова, И.П. Отурин, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2009. – Вып. 20. – С. 120 – 133.
10. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод / О.М. Арсан, О.А. Давидова, Т.М. Дьяченко та ін.; За ред. В.Д. Романенка. – НАН України. Ін-т гідробіології. – К.: Логос, 2006. – 408с.
11. Мікроводорості як кормові об'єкти личинок мідій і устриць: автореферат дисертації на здобуття вченого ступеня канд. біол. наук: 03.00.17 / Л.В. Ладигіна; НАН України, Ін-т біології півд. морів ім. О.О. Ковалевського. – Севастополь, 2007. – 24 с.
12. Мушак П.О. Внутрішньовидова та міжвидова реакція альгологічно чистих культур синьозелених водоростей на зміни умов вирощування / П.О. Мушак // Ukr. botan. Journ. – 2007. - Vol. 64 (1). – Р. 132 – 139.
13. Определение содержания хлорофилла в планктоне пресных водоемов / Сост. Л.А. Сиренко, А.В. Курейшевич – Киев.: Наук. думка, 1982. – 52 с.
14. Отурина И.П. Особенности динамики основных фотосинтетических пигментов и накопление биомассы у микроводоросли *Scenedesmus sp.* – представитель микроальгофлоры пресноводных экосистем. / И.П. Отурина, Е.И. Макарова, А.И. Сидякин // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2010. – Вып. 2. – С. 84 – 91.
15. Campbell D.N. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation / D.N. Campbell, V.H. Hurry, A.K. Clarke // Microbiol.

- Mol. Biol. Rev. — 1998. — № 62 (3). — P. 667 – 683.
16. Geffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations // Biochem. Physiol. Pflanzen. – 1975. – Vol. 167. – P. 191 – 194.
17. Sanchez D.M. Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanos as cosolvent / D.M. Sanchez, C.M. Serrano, M.R. Rodriguez at al. // Journal of Separation Science. – 2008. -№ 31. – P. 1352 – 1362.

THE EFFICIENCY OF GROWING ANABAENA HASSALII (KUTZ.) WITTR. UNDER DIFFERENT CULTIVATION CONDITIONS

L. M. CHEBAN, I. V. MALISCHUK, V. R. LYSAK, M. M. MARCHENKO

*Chernivtsi National University named after Y. Fedkovych,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: larisa.cheban@mail.ru*

*This paper is devoted to the estimation of cultivation efficiency of the unialgal culture *Anabaena hassalii* (Kutz.) Witttr. on the different kinds of medium. The productivity of culture was analyzed by the accumulation of protein and photosynthetic pigments (chlorophyll a and carotenoids). The investigated algae was grown on the Fitzgerald's artificial medium number 11 in the modification of Zehnder and Gorham and on the water from RAS (Recirculation Water System), that was standardized with the indicators pH and total mineralization. The efficiency of *A. hassalii* cultivation on the waste water did not differ from the efficiency of cultivation on artificial medium. During the cultivation on both investigated media it was noted the constant increase of algae biomass, that has reached its maximum on the 40-th day. The similar tendencies were set also during the study of total protein content dynamics and chlorophyll a dynamics. The culture of *A. hassalii* was characterized with maximum content of total protein, that was within 22-23% on the 40-th day of cultivation. It was also observed a gradual increasing of the number of chlorophyll a, which have reached the level of 17-21 mg / g of the dry biomass till the 30-th day of cultivation inclusive on both culture media. It was noticed a linear accumulation of carotenoids in the cells of *A. hassalii* during the whole period of cultivation. The maximum content of carotenoids is observed in the stationary growth phase of culture *A. hassalii* on both nutrient media. The cultivation of microalgae *A. hassalii* on the Fitzgerald's medium and on the water from RAS has similar growth rates and allows to get the actively growing culture that is characterized by constant increase of biomass, high content of total protein and major photosynthetic pigments. The resulting so productive culture can be used for further processing or can continue to cultivate of the fresh culture medium.*

*Keywords: *Anabaena hassalii*, biomass, chlorophyll a, carotenoids, waste water from recirculation water system*

Одержано редколегією 15.10.2014