

УДК 582.263-113:628.315.23

**І. В. Маліщук**, аспірант,

**Л. М. Чебан**, к.б.н., асистент,

**М. М. Марченко**, д.б.н., професор

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,

кафедра біохімії та біотехнології

вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна, e-mail: umwelt@ukr.net

### **ПРОДУКТИВНІСТЬ МОНОКУЛЬТУРИ *CHLORELLA VULGARIS* ВЕЈЕРІНСЬКОЇ, КУЛЬТИВОВАНОЇ НА СКИДНІЙ ВОДІ ІЗ УСТАНОВКИ ЗАМКНУТОГО ВОДОПОСТАЧАННЯ**

Досліджено динаміку біомаси, вміст білка, вуглеводів, ліпідів, хлорофілу *a*, *b*, та каротиноїдів в культурі *C. vulgaris* Вејерінеск, культивованій на скидній воді із установки замкнутого водопостачання (УЗВ). Проведено порівняльну характеристику продуктивних показників періодичної культури в залежності від її початкової забезпеченості основними елементами мінерального живлення. Показано можливість використання скидної води з УЗВ як живильного середовища для культивування *C. vulgaris*.

**Ключові слова:** *C. vulgaris*, скидна вода, білок, ліпіди, вуглеводи, хлорофіл *a*, *b*, каротиноїди, культивування.

Одним із найважливіших факторів успішного вирощування водоростей у культурі є підбір оптимальних живильних середовищ, від складу основних біогенних елементів яких залежить характер росту та продуктивність альгокультури [5]. Загальні підходи в біотехнології мікроводоростей передбачають використання в якості живильних середовищ штучних сумішей макро- та мікроелементів. Однак, штучні живильні середовища є досить вартісними [3]. З іншого боку, тільки змінивши мінеральний склад живильного середовища можна досягти виходу біомаси мікроводоростей з покращеними продуктивними характеристиками [6]. Тому виникає потреба пошуку альтернативних живильних середовищ, що, з одного боку, забезпечували б потребу альгокультури в мінеральних компонентах, а з іншого – дозволили б зменшити собівартість технології отримання біомаси водоростей.

Живильними середовищами можуть виступати стічні води та екстракти з відходів різного походження [2, 13]. Як живильне середовище можна розглядати і скидну воду із рибоводних установок, яка збагачена біогенними елементами, зокрема різними формами азоту. Культивування мікроводоростей на скидній воді, з одного боку, дозволяє провести біологічну очистку води, а з іншого – отримати біомасу, збагачену основними нутрієнтами. Вирощений таким чином фітопланктон може бути використаний для отримання цінних метаболітів або як стартовий живий корм при вирощуванні зоопланктону чи личинок промислово-цінних видів риб [8].

Метою роботи була оцінка продуктивності монокультури *C. vulgaris* Beijerinck, за умов використання скидної води з установки замкнутого водопостачання як живильного середовища.

### Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили на альгологічно чистій культурі водорості *C. vulgaris* Beijerinck (IBASII-A), отриманій з колекції Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України.

Водорість вирощували на скидній воді з рибоводної УЗВ та на середовищі Фітцджеральда № 11 у модифікації Цендера і Горхема, що слугувало середовищем порівняння [3]. Воду забирали з механічного фільтра, розливали на аліквоти, стерилізували в автоклаві при температурі 121 °С протягом 30 хв та стандартизували за показниками рН (7,5–8) та загальної мінералізації (495±5 ppm) [7].

Культивування проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 500 мл при температурі  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , освітленні люмінесцентними лампами близько 2500 лк та 16-ти годинному фотоперіоді [3]. Інокуляцію проводили у співвідношенні інокулят: живильне середовище – 1:10 в стерильних умовах ламінар-боксу. В процесі культивування контролювали фізико-хімічні показники: рН (іонометр U-160 MU) та загальну мінералізацію середовища (кондуктометр Water Quality Tester COM – 100).

Біомасу визначали за густиною культури з використанням оптичного показника при 750 нм 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 *C. vulgaris* визначали експериментально у трьох незалежних повторях [5].

Суспензію мікроводорості осаджували при 8 тис. об/хв протягом 15 хв на Biofuga stratos “Herauses”. У оводнених клітинах визначали кількість білка, ліпідів та вуглеводів [1], загальний вміст хлорофілу  $a$  і  $b$  [9] та сумарних каротиноїдів [12]. Оптичну густину пігментів вимірювали спектрофотометрично на СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 400–800 нм. Розрахунок їх концентрації проводили за формулами [10]. Отримані показники перераховували на абсолютну суху масу.

Визначення кількісного вмісту мінеральних елементів у скидній воді з УЗВ проводили згідно загальноприйнятих методик [4].

Статистичне опрацювання отриманих результатів проводили з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel та методу однофакторного дисперсного аналізу (1-way ANOVA Tukey HSD test) в пакеті прикладних програм STATISTIKA 6.0. Відмінності отриманих результатів вірогідні при рівні значимості  $p \leq 0,01$  за критерієм Фішера.

### Результати та обговорення

Швидкість росту біомаси мікроводоростей може бути зумовлена змінами складу та рН живильного середовища, накопиченням продуктів метаболізму або дефіцитом кисню. Регулювання забезпечення мікроводоростей мінеральними елементами – одна з необхідних умов досягнення високої продуктивності вирощуваної культури [6]. При застосуванні нових живильних середовищ необхідно проводити оцінку їх мінерального складу та контролювати рН середовища впродовж всього терміну культивування. Так, було встановлений подібний якісний склад за основними мінеральними елементами скидної води з рибоводної установки замкнутого водопостачання та середовища Фітцджеральда. В обох випадках спостерігається достатня кількість азоту, фосфору, вуглецю (табл. 1).

Таблиця 1

Кількісний вміст (мг/л) основних мінеральних елементів

Мінеральні компоненти	Варіанти живильного середовища	
	Скидна вода із УЗВ, мг/л	Середовище Фітцджеральда, мг/л
$\text{NO}_3^-$	20,2±0,2	81,7±0,2
$\text{NO}_2^-$	0,62±0,03	-
$\text{NH}_4^+$	0,48±0,02	-
$\text{PO}_4^{3-}$	0,031±0,03	0,040±0,03
$\text{SO}_4^{2-}$	0,094±0,02	0,031±0,01
$\text{CO}_3^{2-}$	0,011±0,03	0,012±0,01
Cl <sup>-</sup>	0,064±0,04	0,011±0,02
$\text{Fe}^{2+}$	0,52±0,02	0,003±0,001
pH	7 – 8	7 – 8

Відомо, що більшість мікроводоростей здатні використовувати азот у нітратній або амонійній формі. Однак, споживання азоту в нітратній формі позитивно впливає на приріст біомаси мікроводоростей, в той час як іони амонію інгібують розвиток культури [3, 6]. Нестача азоту також може призвести до уповільнення росту альгокультури, що відображається і на нутрієнтному складі біомаси. Дещо менша кількість азоту в нітратній формі у складі скидної води із УЗВ, порівняно з середовищем Фітцджеральда, компенсується, можливо, присутністю нітритної та амонійної форми азоту.

Для отримання продуктивної культури мікроводоростей важливою є також початкова кількість заліза у живильному середовищі. Його дефіцит насампе-

ред впливає на синтез пігментів та змінює структуру хлоропластів [3]. Початкова концентрація заліза для *C. vulgaris* може коливатися у межах 0,2–5 мг/л [2]. У складі скидної води із УЗВ цей показник не перевищує рекомендовані кількості та становить 0,52 мг/л. Отже, скидна вода із рибоводної установи містить достатню кількість мінеральних елементів для ефективного розвитку альгокультур, тому може бути використаною як живильне середовище для культивування *C. vulgaris*.

На початкових етапах культивування культура *C. vulgaris* на обох застосованих середовищах характеризувалася низькою ростою активністю, що, очевидно, пов'язано з адаптацією мікроводорості до нових умов. При подальшому культивуванні *C. vulgaris*, кількість біомаси змінювалася у залежності від тривалості культивування та досягала максимального значення на 40 добу (рис. 1).

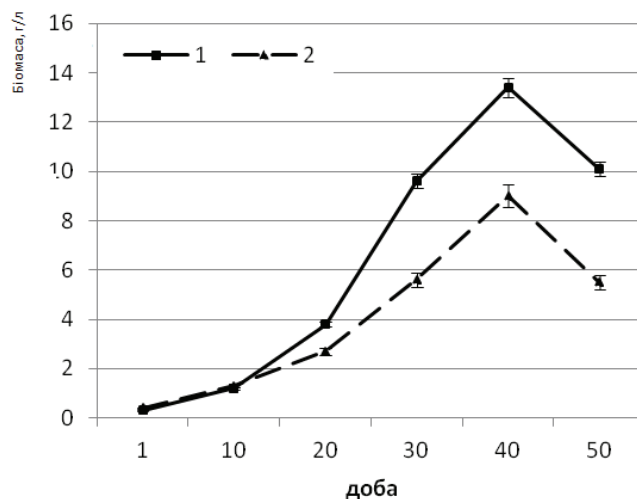


Рис. 1. Динаміка біомаси в культурі *C. vulgaris*, де: 1 – середовище Фітцджеральда, 2 – скидна вода із УЗВ

У експоненційній фазі паралельно з приростом біомаси активуються також процеси біосинтезу [3]. На цьому етапі культура мікроводорості практично необмежена компонентами мінерального живлення, тому кількість основних нутрієнтів у біомасі характеризується найвищими показниками. Починаючи з 40-ї доби експерименту альгокультура переходить у фазу відмирання, що зумовлено зменшенням доступних мінеральних елементів, збільшенням густини клітинної суспензії, накопиченням продуктів обміну.

Для характеристики продуктивності альгокультури, крім оцінки ростових показників, визначали також кількість загального білка, вуглеводів, ліпідів та пігментів. Так, середні значення досліджуваних показників у біомасі *C. vulgaris* достовірно не відрізнялися за умов застосування обох живильних середовищ та знаходились у наступних межах (табл. 2):

Таблиця 2

Хімічний склад біомаси *C. vulgaris* за різних умов культивування

Живильне середовище	Білки, %	Вуглеводи, %	Ліпіди, %
Скидна вода із УЗВ	49,4±0,76	12,4±0,56	14,5±0,63
Середовище Фітцджеральда	51,2±0,45	12,6±0,45	15,1±0,55

Також, при культивуванні *C. vulgaris* на скидних водах із зазначеним вихідним мінеральним складом спостерігали поступове збільшення кількості основних фотосинтезуючих пігментів, впродовж всього терміну культивування (рис. 2). Так, на 40 добу експерименту кількість хлорофілу *a* і *b* у біомасі *C. vulgaris*, культивованій на скидній воді була максимальною, і сягала 11,9 мг/г сухої маси для хлорофілу *a*, та 8,1 мг/г сухої маси – хлорофілу *b*.

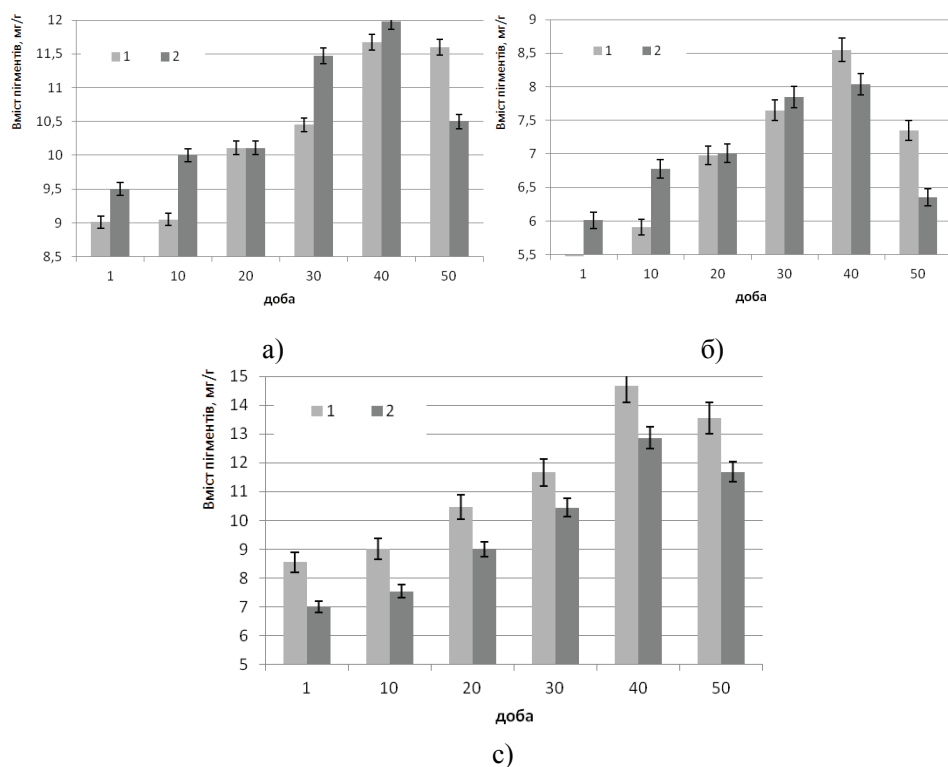


Рис. 2. Загальний вміст хлорофілу *a* (а), *b* (б) та каротиноїдів (с) у біомасі *C. vulgaris*, де: 1 – середовище Фітцджеральда, 2 – скидна вода із УЗВ

Така ж тенденція спостерігалася при вивченні загального вмісту каротиноїдів. Максимальне їх значення відмічене у біомасі *C. vulgaris* на рівні 12,9 мг/г сухої маси при вирощуванні альгокультури на скидній воді та 14,7 мг/г сухої маси – при застосуванні синтетичного середовища.

Відомо, що на вміст основних фотосинтезуючих пігментів, зокрема хлорофілу *a* та каротиноїдів значний вплив має концентрація основних мінеральних компонентів живильного середовища. Так, існує зв'язок між рівнем накопичення пігментів та умовами азотного забезпечення, що, можливо, відображає структурні та функціональні взаємовідносини фотосинтетичної системи [11].

Отже, вміст фотосинтезуючих пігментів у біомасі *C. vulgaris* збільшується до 40 дня культивування на скидній воді та достовірно не відрізняється від аналогічних показників, встановлених за умов використання середовища Фітцджеральда. При подальшому культивуванні відмічене незначне зменшення кількості пігментів на обох живильних середовищах, що пояснюється збільшенням кількості клітин в альгокультурі, виснаженням живильного середовища та дефіцитом деяких мінеральних речовин на термінальних стадіях культивування.

Отже, культивування *C. vulgaris* на скидній воді із УЗВ дозволяє отримати активно ростучу культуру, що характеризується постійним приростом біомаси, високим вмістом загального білка, ліпідів, вуглеводів та основних фотосинтезуючих пігментів. Отримані результати підтверджують можливість використання скидної води з УЗВ як живильного середовища для культивування мікроводоростей.

### Висновки

1. Показана можливість використання скидної води УЗВ як живильного середовища для культивування *C. vulgaris*.
2. Вміст основних біогенних елементів скидної води із рибоводної установки є достатнім для ефективного розвитку альгокультури *C. vulgaris*.
3. Продуктивність культури *C. vulgaris* за показниками (загальний вміст білка, вуглеводів, ліпідів та фотосинтезуючих пігментів) при культивуванні на скидній воді з УЗВ достовірно не відрізнялися від такої за умов використання середовища Фітцджеральда.

### Список використаної літератури

1. Біохімія гідробіонтів / Вогнівенко Л. П., Євтушенко М. Ю., Шевряков М. В. та ін. – Херсон: Олді-плюс, 2009. – 536 с.
2. Голуб Н. Б. Культивування мікроводоростей за використання відходів / Н. Б. Голуб // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2013. – Т. 66, № 6/10. – С. 4–9.
3. Золотарьова О. К. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології / О. К. Золотарьова, Є. І. Шнюкова, О. О. Сиваш, Н. Ф. Михайленко; Під ред. О. К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес., 2008. – 234 с.

4. *Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод* / О. М. Арсан, О. А. Давидов, Т. М. Дьяченко та ін.; За ред. В. Д. Романенка. – НАН України. Ін-т гідробіології. – К.: Логос, 2006. – 408 с.
5. *Отурина И. П.* Особенности динамики основных фотосинтетических пигментов и накопление биомассы у микроводоросли *Scenedesmus sp.* – представителя микроальгофлоры пресноводных экосистем. / И. П. Отурина, Е. И. Макарова, А. И. Сидякин // *Экосистемы, их оптимизация и охрана.* – 2010. – Вып. 2. – С. 84–91.
6. *Паршикова Т. В.* Застосування мікроелементів для оптимізації мінерального живлення за промислового культивування мікроскопічних водоростей / Т. В. Паршикова, В. О. Третьяков, О. В. Пацко // *Физиология и биохимия культ. растений.* – 2010. – Т. 42, № 5. – С. 403–413.
7. *Чебан Л. М.* Ефективність вирощування *Anabaena hassalii* (Kutz.) Wittt. за різних умов культивування / Л. М. Чебан, І. В. Малищук, В. Р. Лисак, М. М. Марченко // *Біологічні системи.* – 2014. – Т. 6, № 2. – С. 145–149.
8. *Brown M. R.* Nutritional value pf microalgae for aquaculture / M. R. Brown, L. E. Cruz-Suarez, D. Ricque-Marie et al // *Avances en Nutricion Acuicola VI. – Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola.* –Cancun, Quintana Roo, Mexico. – 2002. – P. 281–292.
9. *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.
10. *Geffrey S. W.* New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural populations / S. W. Geffrey, G. F. Humphrey // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* – 1975. – Vol. 167. – P. 191–194.
11. *González L. E.* Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* / L. E. **González**, R. O. **Cañizaresb**, S. O. **Bacnaa** // *Bioresource Technology.* – 1997. – V. 60, № 3. – P. 259–262.
12. *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 et al. // *Jornal of Separation Science.* – 2008. – V. 31. – P. 1352–1362.
13. *Yecong L. I.* Characterization of a microalga *Chlorella sp.* well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production / L. I. Yecong, Y. F. Chena, P. F. Chena, and al // *Bioresource Technology.* – 2011. – V. 102, № 8. – P. 5138–5144.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2015

**И. В. Малищук, Л. М. Чебан, М. М. Марченко**

Черновицкий национальный университет имени Юрия Федьковича,  
кафедра биохимии и биотехнологии  
ул. Л. Украинки, 25, Черновцы, 58000, Украина

## **ПРОИЗВОДИТЕЛЬНОСТЬ МОНОКУЛЬТУРЫ *CHLORELLA VULGARIS* ВЕИЖЕРИНСК, КУЛЬТИВИРУЕМОЙ НА СБРОСНЫХ ВОДАХ УСТАНОВОК ЗАМКНУТОГО ВОДООБЕСПЕЧЕНИЯ**

### **Резюме**

Исследовано количество биомассы, содержания белков, углеводов, липидов, хлорофилла *a*, *b*, и каротиноидов в культуре *C. vulgaris*, культивируемой на сбросной воде из установок замкнутого водообеспечения (УЗВ). Проведена сравнительная характеристика показателей продуктивности периодической культуры в зависимости от ее начальной обеспеченности основными элементами минерального питания. Показана возможность использования сбросной воды с УЗВ в качестве питательной среды для культивирования *C. vulgaris*

**Ключевые слова:** *C. vulgaris*, сбросные воды, белок, углеводы, липиды, хлорофилл *a*, *b*, каротиноиды, культивирование.

**I. V. Malischuk, L. M. Cheban, M. M. Marchenko**

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,  
department of Biochemistry and Biotechnology  
25, L. Ukrainka str., Chernivtsi, 58000, Ukraine

**PRODUCTIVITY OF *CHLORELLA VULGARIS* BEIJERINCK  
MONOCULTURE, CULTIVATED ON THE WASTE WATER FROM  
RECIRCULATING AQUACULTURE SYSTEM**

**Summary**

The amount of biomass and the content of proteins, carbohydrates, lipids, chlorophyll *a*, *b* and carotenoids of *C. vulgaris* culture, cultivated on the waste water from Recirculating Aquaculture System (RAS), were investigated. A comparative description of productive parameters of the periodic culture depending on its initial supply by major elements of the mineral nutrition was performed. The possibility of using the waste water from RAS as a culture medium for *C. vulgaris* cultivation was shown.

**Key words:** *C. vulgaris*, waste water, protein, carbohydrates, lipids, chlorophyll *a*, *b*, carotenoids, cultivation.