

ПРОДУКТИВНІСТЬ ЗМІШАНИХ КУЛЬТУР МІКРОВОДОРОСТЕЙ *DESMODESMUS ARMATUS* (CHOD.) HEGEW. ТА *ACUTODESMUS* *DIMORPHUS* (TURPIN) TSARENKO.

Л. М. ЧЕБАН, Е. І. АЛЕКСА, М. М. МАРЧЕНКО

*Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
e-mail: l.cheban@chnu.edu.ua*

Стаття присвячена вивченню продуктивності змішаних культур мікрободоростей *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko. Водорості змішували у наступних співвідношеннях: D/A (1:1), D/A (1:2) та D/A (2:1). Ефективність вирощування змішаних культур порівнювали із такою для монокультур *D. armatus* та *A. dimorphus*. Моно- та змішані культури водоростей вирощували на середовищі Тамія протягом 21 доби, в умовах кліматичної кімнати. Кожні три доби аналізували кількість біомаси за показником густини культури. На кінець стаціонарної фази росту аналізували продуктивність біомаси моно- та змішаних культур. Відмічено, що найбільша кількість біомаси накопичується у змішаній культурі D/A (1:1) на 12 добу культивування. Вміст нутрієнтів у біомасі змішаних культур залежить від умов культивування і значно не відрізняється від такого для монокультур обох видів. Найбільша кількість загального білка відзначено у змішаній культурі D/A (1:1). Вміст хлорофілів а та b незначно відрізняється у трьох варіантів змішаних культур та знаходиться на рівні показника монокультур. Вміст каротиноїдів достовірно зменшився у змішаних культурах порівняно з монокультурами у 1,6 – 1,8 рази. Біомасу змішаної культури *D. armatus* та *A. dimorphus* у співвідношенні 1:1 можна використовувати для вигодовування прісноводного зоопланктону.

Ключові слова: *D. armatus*, *A. dimorphus*, монокультури, змішані культури, продуктивність

Вступ. Основним шляхом отримання біомаси мікрободоростей є шлях накопичувального культивування. Об'єктами промислової аквакультури стають ті види, які складають природну кормову базу риб чи ракоподібних.

Біомаса водоростей легко засвоюється, є доступною для тварин та забезпечує зоопланктон всіма необхідними нутрієнтами (Becker, 2007). В залежності від систематичних особливостей та умов культивування біомаса водоростей може містити від 45 – 70 % білків, у межах 10-30 % ліпідів (Cheban et al., 2015; González López et al., 2010; Kim and Wijesekara, 2010). Також змінюється профіль та кількість деяких жирних кислот і амінокислот (Salama et al., 2013; Samek et al., 2013). Цінність водоростей як корму підвищує ще і те, що вони містять пігменти: каротиноїди, ксантофіли, хлорофіли. В цілому, вміст каротиноїдів та хлорофілу вище в мікрободоростях, ніж у деяких рослин. В додаток, вони містять інші цінні антиоксиданти, такі як 0,01-3% токоферолів (вітамін Е), 0,1-1,5% аскорбінова кислота (вітамін С), і фенольні сполуки. Все це дає можливість використовувати біомасу мікрободоростей як повноцінне джерело нутрієнтів для вигодовування зоопланктону (Castro-Mejia et al., 2016; Macedo et al., 2001).

Більшість промислових культур мікрободоростей на сьогодні вирощують як монокультури, що зумовлено специфікою

технологічного оснащення процесу культивування та високою вартістю очищення кінцевих цільових продуктів. Але за умов отримання біомаси з метою використання її як кормового субстрату доцільним є застосування змішаних культур. Існують повідомлення про те, що навіть ті водорості, що важко культивуються у вигляді монокультур, за умов застосування змішаних культур характеризуються підвищеною продуктивністю за біомасою чи цінними метаболітами (Johnson and Admassu 2013; Novoveská et al., 2016). При культивуванні змішаних культур важливим є як біотичний вплив (кількість та співвідношення інокуляту двох і більше штамів чи видів водоростей), так і абіотичні (освітлення, рН, швидкість перемішування, доступність основних живильних факторів) (Suab et al., 2014; Gopalakrishnan et al., 2018).

Ростові характеристики та біохімічний склад змішаних культур водоростей може значно відрізнятися порівняно із монокультурами (Cai and Duan, 2008; Huang et al., 2011). При цьому має значення розмір клітин водоростей, більша площа поверхні клітини дозволяє водоростям інтенсивніше засвоювати поживні речовини із живильного середовища (Arkronrat et al., 2016). Показано, що у змішаній культурі водоростей значно підвищується продуктивність біомаси (Cai

and Duan, 2008; Arkronrat and Oniam, 2014; Brito et al., 2013).

Метою даної роботи було дослідження особливостей культивування змішаних культур водоростей та аналіз отриманої біомаси за основними показниками продуктивності.

Матеріали та методи. Матеріалом для дослідження слугували колекційні культури *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, отримані з колекції Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Водорості культивували в стерильних умовах на середовищі Тамія. 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, протягом 23 діб. Культури *D. armatus* та *A. dimorphus* D/A змішували у наступних співвідношеннях: (1:1), (1:2) та (2:1).

Кількість біомаси визначали за густиною культури з використанням оптичного показника при 750 нм на CaryWin UV 60 (Agilent, США). Перехід від одиниць оптичної густини (D_{750}) до величини абсолютно сухої біомаси (АСБ) здійснювали через емпіричний коефіцієнт k : АСБ = $k \times D_{750}$. Коефіцієнт k ($k = \text{г од.опт.густини/л}$) для *D. armatus* та *A. dimorphus* визначали експериментально у трьох незалежних повторях.

Біохімічний аналіз здійснювали на пробах, які були відібрані наприкінці стаціонарної фази. Визначення загального вмісту білка, ліпідів та вуглеводів проводили за стандартними

методиками (Folch, 1957; Lowry, 1951; Anschau, 2017).

Для визначення пігментів клітини осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 15 хв. Пігменти екстрагували сумішшю хлороформ : етанол (2:1) до повного знебарвлення екстракта. Оптичну густина екстрактів вимірювали при довжинах хвиль, що відповідають максимуму хлорофілу *a*, хлорофілу *b* та каротиноїдів. Розрахунок кількості пігментів проводили за типовими формулами. Всі значення перераховували на абсолютно суху масу.

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 у таблицях та на графіках представлені як $M \pm m$.

Результати та їх обговорення. Спільне культивування водоростей призводить до зміни характеру росту культур. Протягом перших шести діб вирощування спостерігається подібний характер росту для всі варіантів культур (рис.1). Монокультури обох видів досягають максимуму біомаси на 15 добу культивування, після чого спостерігається поступове призупинення ростової активності.

У змішаній культурі D/A (1:1) спостерігалось декілька піків за кількістю біомаси – на 6, 12 та 18 добу. Кількість біомаси у цій культурі на 6 добу становила 5,94 г/л, а на 12 – 7,69 г/л та перевищувала показники всіх інших варіантів дослідження.

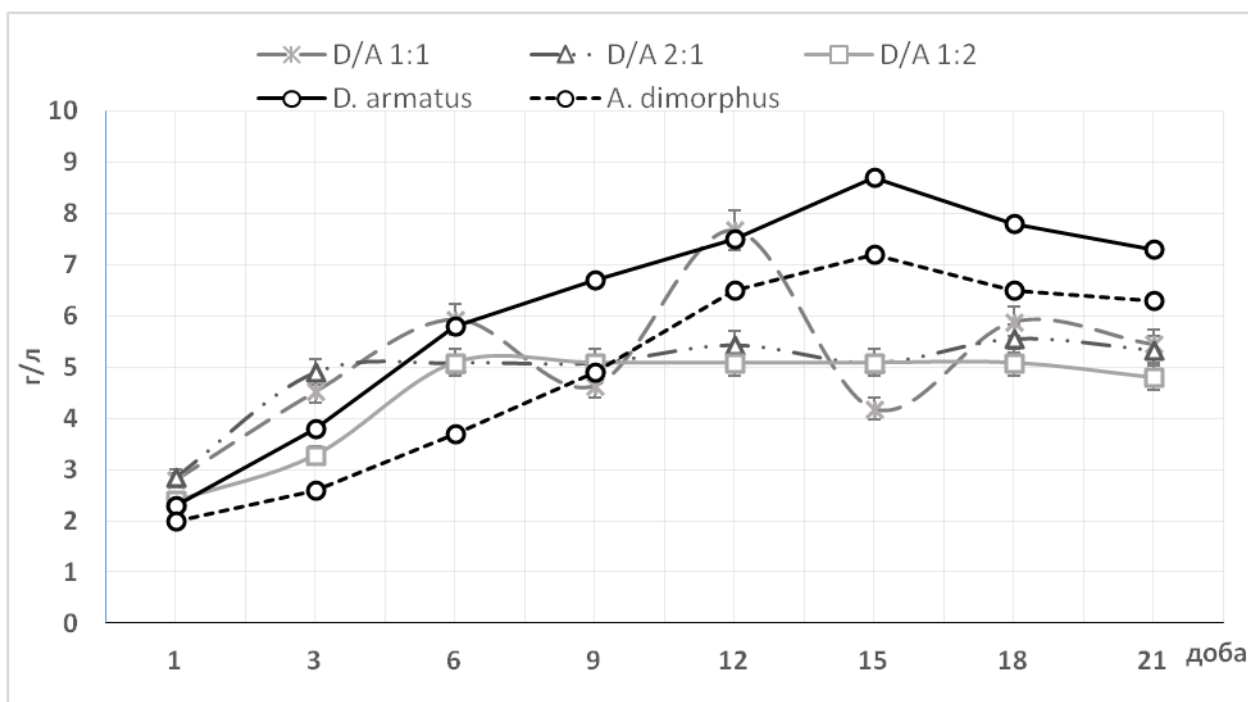


Рис. 1. Динаміка біомаси моно- та змішаних культур *D. armatus* та *A. dimorphus*

Fig. 1. The biomass dynamics of mono- and mixed culture *D. armatus* and *A. dimorphus*

У змішаних культурах зі співвідношенням D/A (1:2) та D/A (2:1) не спостерігали таких різких коливань значень. У процесі вирощування змішаної культури D/A (2:1) поступово нагромаджувалась біомаса, найбільше значення зафіксовано на 12 добу культивування. Культура D/A (1:2) характеризувалась найнищою ростовою активністю. Також не спостерігається чіткої градації фаз кривої росту культури. Починаючи з 6 доби кількість біомаси D/A (1:2) відповідає стаціонарній фазі росту і практично не змінюється впродовж всього вирощування на живильному середовищі.

Не дивлячись на неоднорідний ріст змішаних культур водоростей протягом всього терміну культивування на 12 добу найбільшою кількістю біомаси характеризувалась культура D/A (1:1). Тому оптимальний варіант отримання біомаси змішаних культур *D. armatus* та *A. dimorphus* – вирощування культури D/A (1:1) протягом 12 діб.

Біохімічний склад біомаси мікрроводоростей теж може змінюватись, коли два або більше видів водоростей культивується у живильному середовищі. Відомо, що біомаса *D. armatus* та *A. dimorphus* характеризується достатньо високим вмістом білка (Cheban et al., 2015). При подальшому використанні біомаси змішаних культур як кормового субстрату, наприклад для безхребетних, важливим є співвідношення основних нутрієнтів, які формують поживний профіль корму (Jason et al., 2018).

Накопичення білків у моно- та полікультурах може відрізнятися в 2-3 рази як в сторону збільшення, так і в сторону зменшення їхньої кількості.

Найбільший вміст загального білка виявлено у культурі D/A (1:1) і становив 59,5 % (табл.1). У

культурі D/A (2:1) трохи менше – 48 %, а у культурі D/A (1:2) найменше, тільки 36 %. Потрібно відмітити, що монокультури обох водоростей продукують кількість білка на рівні змішаної культури у співвідношенні 2:1.

Максимальна кількість ліпідів встановлена у культурі зі співвідношенням D/A (1:1) і знаходиться в межах 30,6%. Достатньо високий вміст ліпідів характеризується культура D/A (2:1) і становить 24,1%. Найменша кількість ліпідів була виявлена в культурі D/A (1:2) і становить лише 17,3%. Проте навіть такі результати були на рівні із показниками монокультур. Відмічено, що кількість білків збільшилась у змішаних культурах водоростей у порівнянні з монокультурами. Вміст ліпідів збільшився лише у культурі D/A (1:1). Проте у цьому варіанті дослідження відмічений найменший вміст вуглеводів, всього 13,2 %.

Пігментний апарат зелених водоростей складається з комплексу, хлорофілу *a*, *b* та каротиноїдів (табл. 2). Вміст пігментів у змішаних культурах зменшився у порівнянні з монокультурами. Так, у культурі D/A (1:1) вміст хлорофілу *a* найвищий – 10,4мг/г і знаходиться на рівні обох монокультур водоростей. У змішаній культурі D/A (1:2) вміст хлорофілу *a* характеризується найменшим значенням – 6,9 мг/г. Змішана культура D/A (2:1) характеризується середніми значеннями вмісту хлорофілу *a* - 8,68мг/г.

Вміст каротиноїдів у всіх трьох досліджуваних культурах майже не відрізняється і знаходиться в межах 7,07 – 6,6 мг/г. Однак ці показники були достовірно нижчими, ніж аналогічні у монокультур *D. armatus* та *A. dimorphus*.

Таблиця 1.
Біохімічні параметри моно- та змішаних культур
D. armatus* та *A. dimorphus

Table 1.
Biochemical parameters of mono- and mixed culture *D. armatus* and *A. dimorphus*
($M \pm m$, $n=3$, $p \leq 0,05$)

Варіанти дослідів	Загальний білок, %	Ліпіди, %	Вуглеводи, %
<i>D. armatus</i>	46,5±1,71	23,3±1,12	25,4±1,43
<i>A. dimorphus</i>	45,5±1,92	16,8±0,89	34,2±1,55
D/A 1:1	59,5±2,27*	30,6±1,34*	13,2±0,57*
D/A 1:2	36,6±1,34*	17,3±0,84	37,8±1,32
D/A 2:1	48,1±2,01	24,1±1,22	28,9±1,18

Примітка: * - достовірна відмінність значень змішаних культур відносно значень монокультур

Таблиця 2.
Пігменти моно- та змішаних культур *D. armatus*
та *A. dimorphus*

Table 2.
Pigments of mono- and mixed culture *D. armatus* and
A. dimorphus
($M \pm m$, $n=3$, $p \leq 0,05$)

Варіанти досліджу	Хлорофіл <i>a</i> , мг/г сухої сировини	Хлорофіл <i>b</i> , мг/г сухої сировини	Каротиноїди, мг/г сухої сировини
<i>D. armatus</i>	11,2±0,56	7,07±0,27	12,7±0,59
<i>A. dimorphus</i>	9,8±0,35	7,01±0,34	11,9±0,60
D/A 1:1	10,4±0,45	6,5±0,21*	7,07±0,33*
D/A 1:2	8,7±0,23*	5,4±0,20*	6,43±0,28*
D/A 2:1	6,9±0,17*	5,1±0,16*	6,6±0,27*

Примітка: * - достовірна відмінність значень змішаних культур відносно значень монокультур

Отже, у змішаних культурах інтенсивні ростові процеси тривають до 12 доби. Змішана культура *D. armatus* та *A. dimorphus* у співвідношеннях 1:1 характеризується найвищим рівнем накопичення біомаси – 7,69 г/л. Вміст білків та ліпідів у клітинах водоростей, також, відрізняється у всіх трьох досліджуваних змішаних культурах, найбільший вміст цих сполук виявлено у змішаній культурі *D. armatus* та *A. dimorphus* у співвідношенні 1:1.

В результаті проведеної роботи, нам вдалося отримати змішану культуру (D/A) у співвідношенні 1:1, яка характеризувалася найвищими показниками біомаси, білків та ліпідів порівняно як з іншими змішаними культурами, так і з монокультурами даних видів. Отриману біомасу змішаної культури *D. armatus* та *A. dimorphus* у співвідношенні 1:1 можна в подальшому використовувати для вигодовування прісноводного зоопланктону.

References:

1. Anschau A., Caruso C., Kuhn R., Franco T. Validation on the sulfo-phospho-vanillin (SPV) method for the determination of lipid content in oleaginous microorganisms. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2017; 34: 19-27. doi: 10.1590/0104-6632.20170341s20140222.
2. Arkronrat W., Deemark P., and Oniam V. Growth performance and proximate composition of mixed cultures of marine microalgae (*Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp.) with monocultures. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2016; 38 (1): 1-5.
3. Arkronrat W. and Oniam V. Growth performance of mixed culture of microalgae (*Chlorella* & *Tetraselmis*) with monocultures under laboratory conditions. *Proceeding of 4th International Fisheries Symposium (IFS 2014)*, Surabaya, Indonesia, October 30-31, 2014; p. 200.
4. Becker E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol. Adv.* 2007; 25: 207–210. DOI:10.1016/j.biotechadv.2006.11.002
5. Brito D., Castro A., Guevara M., Gómez E., Villarroel A. and Aron N.M. Biomass and pigments production of the mixed culture of microalgae (*Hyaloraphidium contortum* and *Chlorella vulgaris*) by cultivation in media based on commercial fertilizer. *AUDJG-Food Technology*. 2013; 37: 85-97.
6. Cai Z.P. and Duan S.S. Growth in polyculture of algae, *Dunaliella salina* and *Platymonas subcordiformis*. *Fisheries Science*. 2008; 27: 330-333. DOI: 10.5897/AJB10.2231
7. Castro-Mejia J., Ocampo-Cervantes J.A., Castro-Mejia G., Cruz-Cruz I., Monroy-Dosta M. del C., Becerril-Cortes D. Laboratory production of *Daphnia magna* (Straus, 1820) fed with microalgae and active dry yeast. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2016; 4 (2): 548 – 553.
8. Cheban L., Malischuk I., Marchenko M. Peculiarities of cultivation *Desmodedasmus armatus* (Chocl.) Hegew. in the wash water from RAS. *Arch. Pol. Fish.* 2015; 23 (3): 155-162.
9. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957; 226: 497–509.
10. González López C. V., García M. C. C., Fernández F. G. A., Bustos C. S., Chisti Y., Sevilla J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour. Technol.* 2010; 101: 7587–7591. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.077
11. Gopalakrishnan K., Roostaei J., Zhang Y. Mixed culture of *Chlorella* sp. and wastewater wild algae for enhanced biomass and lipid accumulation in artificial wastewater medium. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2018; 12-14. https://doi.org/10.1007/s11783-018-1075-2
12. Huang W.W., Dong B.Z., Cai Z.P. and Duan, S.S. Growth effects on mixed culture of *Dunaliella salina* and *Phaeodactylum tricornutum* under different inoculation densities and nitrogen concentrations. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10: 13164-13174.
13. Jason A., Crisp Frances M. L., et al. Performance of Mixed Species and Mono-specific Algal Diets for

- Culture of Larval Western School Prawns, *Metapenaeus dalli*. *J. of World Aquaculture Society*. 2018; 49 (5): 845-856.
14. Johnson K R, Admassu W. Mixed algae cultures for low cost environmental compensation in cultures grown for lipid production and wastewater remediation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2013; 88(6). <https://doi.org/10.1002/jctb.3943>
 15. Kim S.K., Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods*. 2010; 2: 1–9.
 16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
 17. Macedo C.F., Pinto-Coelho R.M. Nutrition status of *Daphnia laevis* and *Moina micrura* from a tropical reservoir to different algal diets: *Scenedesmus quadricauda* and *Ankistrodesmus glacilis*. *Braz. J. Biol.* 2001; 61(4): 555-562.
 18. Novoveská L., T.Franks D., Wulfers T. A., Henley W. J. Stabilizing continuous mixed cultures of microalgae. *Algal Research*. 2016; 13:126-133. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.11.021>
 19. Salama E. S., Kim H. C., Abou-Shanab R. I., Ji M. K., Oh Y. K., Kim S. H., et al. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2013; 36: 827–833. doi: 10.1007/s00449-013-0919-1
 20. Samek D., Mišurcová L., Machů L., Buňka F., Fišera M. Influencing of amino acid composition of green freshwater algae and cyanobacterium by methods of cultivation. *Turk. J Biochem.* 2013; 38 (4): 360–368. doi: 10.5505/tjb.2013.42104
 21. Suab Y., Mennerichb A., Urbana B. Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. *Bioresource Technology*. 2012; 118: 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.093>

PRODUCTIVITY OF THE MIXED CULTURE OF MICROALGAE *DESMODESMUS ARMATUS* (CHOD.) HEGEW. AND *ACUTODESMUS DIMORPHUS* (TURPIN) TSARENKO

L. M. Cheban E. I. Aleksa M. M. Marchenko

*The article is devoted to the study of the productivity of mixed cultures of microalgae *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. and *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko. Algae were mixed in the following ratios: D/A (1:1), D/A (1:2) and D/A (2:1). The efficiency of mixed cultures growing was compared with that for monocultures of *D. armatus* and *A. dimorphus*. Mono- and mixed cultures of algae were grown in Tamiya for 21 days, in a climatic room. Every three days, the amount of biomass was analyzed according to the density of the culture. By the end of the stationary growth phase, the biomass productivity of mono- and mixed algal cultures was analyzed.*

*It was noted that the largest amount of biomass accumulates in the mixed D/A culture (1:1) on the 12th day of cultivation. The nutrient content in the mixed cultures biomass depends on cultivation conditions and does not significantly differ from that for monocultures of both species. The highest amount of total protein was observed in the mixed D/A culture (1:1). The content of chlorophyll a and b differs slightly in the three variants of mixed cultures and is at the level of the monoculture indicator. The content of carotenoids conclusively decreased in 1.6 - 1.8 times in mixed cultures as compared to monocultures. The biomass of a mixed culture of *D. armatus* and *A. dimorphus* in a 1: 1 ratio can be used to grow the freshwater zooplankton.*

*Keywords: *D. armatus*, *A. dimorphus*, monocultures, mixed cultures, productivity*

Отримано редколегією 28.04.2019