

УДК 582.263

**ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ
ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ *SCOTIELLOPSIS RUBESCENS*
VINATZ. (CHLOROPHYCEAE)**

Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В.

*Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского НАН Украины,
Севастополь, Украина
E-mail: chubchikova@mail.ru*

Исследован процесс роста вегетативной культуры зеленой микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в питательных средах с различными комбинациями начальных концентраций азота в минеральной (нитрат натрия) и органической (карбамид) формах и фосфора. Результаты двух экспериментов обработаны методом построения обобщенного параметра оптимизации, объединяющего среднюю и максимальную удельную скорость роста, среднюю продуктивность культур, содержание сухого вещества на клетку, а также массовую долю хлорофилла *a* и суммарных первичных каротиноидов. Показано, что сочетание средних концентраций азота (независимо от природы его источника) и фосфора обеспечивает высокие значения продукционных характеристик культур *S. rubescens*. Учет доли выноса азота и фосфора из питательной среды позволяет рассчитать их начальные концентрации, достаточные для получения активно растущей зеленой культуры скотиеллопсиса: 215 мг N·л⁻¹ и 30 мг P·л⁻¹.

Ключевые слова: *Scotiellopsis rubescens*, обобщенный параметр оптимизации, скорость роста, сухое вещество, пигменты.

ВВЕДЕНИЕ

Представленная работа входит в цикл экспериментов, направленных на разработку методики лабораторного культивирования зеленых микроводорослей-экстремобионтов [1–3], обладающих способностью к синтезу кетокаротиноида астаксантина. Эти виды являются коммерчески перспективными его источниками при выращивании их методом двухстадийной накопительной культуры [4–7].

Цель работы – оценка ростовых характеристик *S. rubescens* в зависимости от обеспеченности элементами минерального питания и подбор оптимальных начальных концентраций азота и фосфора в питательной среде для *S. rubescens* на стадии вегетативного роста методом построения обобщенного параметра оптимизации [8]. Основные задачи исследования: 1. Оценка продукционных характеристик и состояния культур *S. rubescens* при различных комбинациях начальных концентраций азота (x_1) и фосфора (x_2). 2. Определение остаточного содержания азота и фосфора в питательной среде как дополнительного критерия для определения их оптимальных начальных концентраций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах, проведенных в мае–июне 2010 г., использовали штамм *Scotiellopsis rubescens* Vinatzer 1975 (пор. Scenedesmales) [9], который был передан в ИнБИОМ НАНУ из коллекции Института физиологии растений РАН в 2006 г. под номером IPPAS Н-350. В качестве инокулята использовали культуру, выращиваемую в накопительном режиме на среде BBM при одностороннем боковом освещении люминесцентными лампами «Feron» DL 20W T4 6400K с интенсивностью 4000 Лк (фотопериод 15 ч свет : 9 ч темнота), температуре 25 – 26 °С, барботаже стерильным воздухом со скоростью 0.3 л·мин⁻¹ в течение 3 – 4-х дней, что соответствует экспоненциальной фазе роста. В экспериментах *S. rubescens* выращивали в стеклянных конических колбах объемом 100 мл; объем культур составлял 70 мл, в условиях, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Условия культивирования *Scotiellopsis rubescens* в экспериментах

№ эксп.	Источник азота	Начальная численность, $N \cdot 10^6$ кл.·мл ⁻¹	Освещенность, Лк	Фотопериод, свет: темнота, ч	Способ перемешивания культур	Температура, световая темновая фазы, °С	Время культивирования, сут
1	Нитрат натрия NaNO ₃	1.41 – 1.73	7000	15 С : 9 Т	Непрерывно, воздух + 0.2 % CO ₂ , 0.5 л·мин ⁻¹	<u>25-28</u> 20-22	9
2	Карбамид (NH ₂) ₂ CO	1.36 – 1.69	7000	15 С : 9 Т	Непрерывно, воздух + 0.2 % CO ₂ , 0.5 л·мин ⁻¹	<u>25-28</u> 20-22	5

Основой питательной среды служила среда BBM, в которую азот (N) в неорганической (нитрат натрия NaNO₃) или органической (карбамид (NH₂)₂CO) форме и фосфор (P) в форме K₂HPO₄·3H₂O и KH₂PO₄ (в том же соотношении, что и в среде BBM) вносили в соответствии с матрицей планирования (табл. 2, 3).

Таблица 2

Факторы, включенные в эксперименты

№	Наименование фактора	Обозначение	Размерность	Область интереса
1	Начальная концентрация N	x ₁	мг·л ⁻¹	40 – 400
2	Начальная концентрация P	x ₂	мг·л ⁻¹	10 – 80

Таблица 3

Кодирование факторов

Факторы	x _i	x ₁	x ₂	x _i
Верхний уровень	x _{i верх}	400	80	+1
Нижний уровень	x _{i нижн}	40	10	-1
Средний уровень	x _{i 0}	220	45	0

Каждый эксперимент включал 9 вариантов. Варианты № 1 – 4 выполняли в трехкратной повторности, варианты № 5 – 9 – в одной повторности. Место каждой колбы на экспериментальном стенде определяли методом случайных чисел. Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием компьютерной программы «Microsoft Excel».

В экспериментах определяли параметры, которые характеризуют продукционные показатели и состояние культур *S. rubescens*, выращиваемых на питательных средах с различной комбинацией начальных концентраций азота и фосфора. Помимо средней удельной скорости роста культур ($\mu_{N\text{cp}}$), это максимальная удельная скорость роста ($\mu_{N\text{max}}$) – показатель, характеризующий потенциальные возможности вида, и средняя продуктивность культур, рассчитанная по численности клеток ($P_{N\text{cp}}$). Кроме этого, учитывали содержание сухого вещества (СВ) в клетке, а также массовую долю в СВ хлорофилла *a* (Хла, %СВ) и суммарных каротиноидов ($\Sigma\text{КР}$, %СВ) – косвенные критерии физиологического состояния клеток в конце экспериментов.

Численность клеток (N , кл·мл⁻¹) в культурах определяли методом прямого счета в камере Горяева. Удельную скорость роста (μ_N , сут⁻¹), среднюю и максимальную, и среднесуточную продуктивность (P_N , кл·мл⁻¹·сут⁻¹) – по формулам [10]:

$$\mu_N = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}, \text{ и} \quad (1)$$

$$P_N = \frac{N_2 - N_1}{t_2 - t_1}, \quad (2)$$

соответственно, где N_1 и N_2 – начальная и конечная численность клеток, $t_2 - t_1$ – промежуток времени. Содержание сухого вещества (СВ, мг·кл⁻¹) определяли весовым методом на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах «Sartorius» с диаметром пор 3 мкм. Содержание пигментов – спектрофотометрически с использованием уравнений, предложенных для Chlorophyta [11]. Остаточные концентрации нитратного азота (мг N·л⁻¹) в среде определяли ионоселективным электродом ЭМ–NO₃–07, фосфора (мг P·л⁻¹) – по [12].

Для выявления оптимальных комбинаций начальных концентраций N и P использовали метод построения обобщенного параметра оптимизации (Y), объединяющий следующие частные параметры (отклики): $\mu_{N\text{cp}}$; $\mu_{N\text{max}}$; $P_{N\text{cp}}$; СВ; Хла, % СВ; $\Sigma\text{КР}$, % СВ. При этом каждый преобразованный частный параметр приобретает значение 0 или 1, и обобщенный параметр оптимизации рассчитывается по формуле [8]:

$$Y = \sqrt[n]{\prod_1^n}, \quad (3)$$

где n – количество частных параметров, определяемых в каждом эксперименте, \prod – произведение преобразованных значений частных параметров для каждого варианта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сопоставимости результатов ростовые характеристики *S. rubescens* представлены за 5 суток. В течение этого времени численность клеток в культурах во всех вариантах увеличилась на порядок (рис. 1).

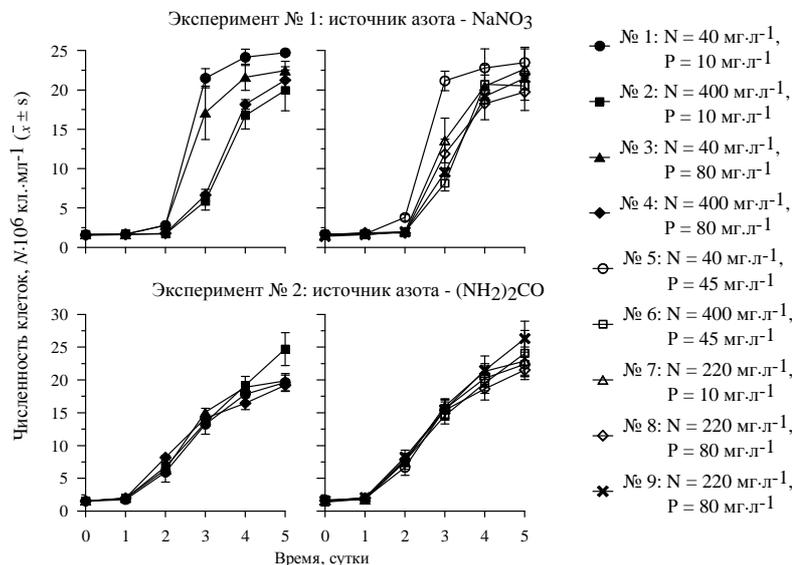


Рис. 1 Динамика численности клеток *Scotiellopsis rubescens* в течение 5 суток при различных условиях минерального питания. № 1, 2 и т. д. – номера вариантов.

Значения средней и максимальной удельной скорости роста, а также продуктивности культур ($\mu_{N\text{ ср}}$, $\mu_{N\text{ max}}$, $P_{N\text{ ср}}$, соответственно) значительно превышали полученные нами для этого вида ранее на среде ВВМ 3N [7] (табл. 5, 6). Несмотря на широкий диапазон заданных начальных концентраций N и P, в различных вариантах двух экспериментов, независимо от природы источника азота, каждый из этих показателей изменялся незначительно. Это можно объяснить неприхотливостью исследуемого вида и его способностью выживать в постоянно меняющихся и зачастую крайне неблагоприятных условиях, характерной для всех экстремобионтов.

В эксперименте № 1 (источник азота – нитрат натрия) однонаправленное изменение концентраций азота и фосфора оказывает незначительное положительное влияние на $\mu_{N\text{ ср}}$, самые высокие значения которой зафиксированы в условиях минимальных и средних концентраций азота и фосфора (опыты № 1 и 9), а $\mu_{N\text{ max}}$ – при минимальной и средней концентрациях азота, независимо от концентрации фосфора (варианты № 1, 3, 5, 7 и 9). В тех же условиях при замене нитрата натрия на карбамид (эксперимент № 2) $\mu_{N\text{ ср}}$ и $\mu_{N\text{ max}}$ достигает наивысших значений в опытах с максимальной и средней концентрациями азота и средней – фосфора (варианты № 7 и 9). Кроме того, период лаг-фазы сокращается с 2 до 1 суток

(рис. 1). Влияние начальных концентраций N и P в среде на содержание СВ в клетках *S. rubescens* оказалось незначительным, но массовая доля Хл *a* и \sum КР в биомассе скотииеллопсиса в 2 – 3 раза выше в вариантах с высокими и средними концентрациями азота, по сравнению с низкими, независимо от природы его источника.

Таблица 4
Натуральные (Н) и преобразованные (П) показатели состояния культур *S. rubescens* при различных комбинациях начальных концентраций азота и фосфора в среде. Y – обобщенный параметр оптимизации. Эксперимент № 1.
Источник азота – нитрат натрия

№ вар.	x ₁	x ₂	$\mu_{Ncp}, \text{сут}^{-1}$		$\mu_{Nmax}, \text{сут}^{-1}$		$P_{Ncp}, 10^6 \text{ кл}\cdot\text{мл}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$		СВ, пг·кл. ⁻¹		Хл <i>a</i> , % СВ		\sum КР, % СВ		Y
			Н	П	Н	П	Н	П	Н	П	Н	П	Н	П	
1	-1	-1	0.548 ± 0.011	1	2.041 ± 0.124	1	4.62 ± 0.07	1	84.82 ± 4.86	0	0.28 ± 0.02	0	0.54 ± 0.03	0	0
2	+1	-1	0.500 ± 0.015	0	1.232 ± 0.158	0	3.66 ± 0.50	0	84.81 ± 6.29	0	1.46 ± 0.05	1	1.46 ± 0.12	1	0
3	-1	+1	0.520 ± 0.005	0	1.790 ± 0.188	1	4.16 ± 0.23	1	79.86 ± 2.91	0	0.30 ± 0.01	0	0.57 ± 0.02	0	0
4	+1	+1	0.524 ± 0.030	0	1.323 ± 0.019	0	3.94 ± 0.36	0	95.87 ± 1.54	1	1.24 ± 0.02	1	1.34 ± 0.06	1	0
5	-1	0	0.534	1	1.717	1	4.37	1	78.71 ± 1.57	0	0.28 ± 0.00	0	0.54 ± 0.00	0	0
6	+1	0	0.500	0	1.414	0	3.77	0	90.65 ± 0.28	1	1.31 ± 0.05	1	1.51 ± 0.00	1	0
7	0	-1	0.532	1	1.931	1	4.22	1	100.10 ± 1.94	1	1.19 ± 0.02	1	1.33 ± 0.15	1	1
8	0	+1	0.499	0	1.883	1	3.62	0	100.55 ± 0.94	1	1.41 ± 0.02	1	1.57 ± 0.09	1	0
9	0	0	0.540	1	1.569	1	4.02	1	92.22 ± 2.10	1	1.26 ± 0.06	1	1.33 ± 0.13	1	1
Ср. по эксперим.			0.522 ± 0.019		1.655 ± 0.286		4.04 ± 0.34		89.73 ± 8.19		0.48 ± 0.22		1.13 ± 0.44		–

Результаты экспериментов показали, что *S. rubescens* способен активно расти на среде как с минеральным, так и органическим источником азота. Средние по каждому из экспериментов значения ростовых характеристик культур, выращиваемых на нитратной и карбамидной средах, различаются незначительно (табл. 4, 5).

Таблица 5.

Натуральные (Н) и преобразованные (П) показатели состояния культур *S. rubescens* при различных комбинациях начальных концентраций азота и фосфора в среде. Y – обобщенный параметр оптимизации. Эксперимент № 2. Источник азота – карбамид.

№ вар.	x ₁	x ₂	μ _{Ncp} , сут ⁻¹		μ _{Nmax} , сут ⁻¹		P _{Ncp} · 10 ⁶ кл·мл ⁻¹ ·сут ⁻¹		СВ, пг·кл. ⁻¹		Хл а, % СВ		ΣКР, % СВ		Y
			Н	П	Н	П	Н	П	Н	П	Н	П	Н	П	
1	-1	-1	0.511 ± 0.017	0	1.194 ± 0.038	0	3.62 ± 0.28	0	61.19 ± 1.97	0	0.55 ± 0.02	0	0.71 ± 0.05	0	0
2	+1	-1	0.556 ± 0.025	1	1.229 ± 0.082	0	4.64 ± 0.51	1	62.30 ± 5.04	0	1.42 ± 0.13	1	1.56 ± 0.11	1	0
3	-1	+1	0.509 ± 0.009	0	1.172 ± 0.081	0	3.66 ± 0.18	0	69.38 ± 4.63	1	0.47 ± 0.03	0	0.70 ± 0.02	0	0
4	+1	+1	0.508 ± 0.022	0	1.410 ± 0.064	1	3.53 ± 0.18	0	67.66 ± 6.23	1	1.20 ± 0.03	1	1.39 ± 0.09	1	0
5	-1	0	0.517	0	1.241	0	4.14	1	54.75 ± 0.32	0	0.61 ± 0.06	0	0.81 ± 0.08	0	0
6	+1	0	0.574	1	1.392	1	4.54	1	60.71 ± 1.18	0	1.17 ± 0.06	1	1.34 ± 0.01	1	0
7	0	-1	0.537	1	1.460	1	4.26	1	73.01 ± 2.47	1	1.22 ± 0.09	1	1.34 ± 0.07	1	1
8	0	+1	0.524	0	1.374	1	3.99	0	72.56 ± 3.95	1	1.49 ± 0.01	1	1.61 ± 0.05	1	0
9	0	0	0.564	1	1.388	1	4.95	1	65.97 ± 0.27	1	1.34 ± 0.03	1	1.55 ± 0.06	1	1
Ср. по эксперим.			0.533 ± 0.026		1.318 ± 0.108		4.15 ± 0.50		65.28 ± 6.05		0.51 ± 0.19		1.22 ± 0.38		-

Очевидно, что для подбора состава среды, отражающей потребности *S. rubescens* в N и P на «зеленой» стадии культивирования в данных условиях освещенности и температуры, нельзя ориентироваться на значения одного из параметров оптимизации. Возможность комплексной оценки состояния культур исследуемого вида дает построение обобщенного параметра оптимизации (Y), учитывающего все характеристики исследуемого вида, полученные в ходе экспериментов. Для этого натуральные значения показателей роста и состояния культур (частные отклики) преобразовали, используя критерии, приведенные в табл. 6.

Согласно обобщенным параметрам оптимизации, построенным для 2-х экспериментов и представленным в табл. 4 и 5, условиям, обеспечивающим высокие значения продукционных характеристик культур *S. rubescens* при удовлетворительном состоянии клеток, наиболее отвечают варианты № 7 и 9 при выращивании как на нитратной, так и на карбамидной среде. Это средняя концентрация азота (220 мг N·л⁻¹) и средняя и минимальная – фосфора (45 и 10 мг P·л⁻¹, соответственно).

Таблица 6
Критерии преобразования частных откликов для построения обобщенного параметра

№ exper., источник азота	$\mu_{Ncp}, \text{сут}^{-1}$	$\mu_{Nmax}, \text{сут}^{-1}$	$P_N \text{ ср.}, 10^6 \text{ кл.} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$	СВ, $\text{пг} \cdot \text{кл.}^{-1}$	Хла, % СВ	$\sum \text{КР}, \% \text{ СВ}$
№ 1, нитрат натрия	$\leq 0.525=0$ $> 0.525=1$	$\leq 1.550=0$ $> 1.550=1$	$\leq 4.00=0$ $> 4.00=1$	$\leq 85.00=0$ $> 85.00=1$	$\leq 0.40=0$ $> 0.40=1$	$\leq 0.80=0$ $> 0.80=1$
№ 2, карбамид	$\leq 0.530=0$ $> 0.530=1$	$\leq 1.350=0$ $> 1.350=1$	$\leq 4.00=0$ $> 4.00=1$	$\leq 65.00=0$ $> 65.00=1$	$\leq 0.50=0$ $> 0.50=1$	$\leq 1.00=0$ $> 1.00=1$

В качестве дополнительного критерия подбора оптимальных начальных концентраций элементов минерального питания была выбрана полнота поглощения культурами скотиеллопсиса нитратного азота и фосфора из питательной среды (табл. 7).

Таблица 7
Остаточные концентрации нитратного азота и фосфора в культуральных средах и полнота их поглощения при различных комбинациях их начальных концентраций. Эксперимент № 1

№вар.	Азот			Фосфор		
	Концентрация, $\text{мг N} \cdot \text{л}^{-1}$		Доля выноса N, %	Концентрация, $\text{мг P} \cdot \text{л}^{-1}$		Доля выноса P, %
	Начальная	Конечная		Начальная	Конечная	
1	40	0	100	10	0	100
2	400	204.0	48.2	10	0	100
3	40	0	100	80	46.5	41.9
4	400	203.8	48.2	80	49.3	38.4
5	40	0	100	45	26.9	40.3
6	400	176.8	55.0	45	16.5	63.4
7	220	0	100	10	0	100
8	220	1.47	98.78	80	46.6	41.7
9	220	2.63	98.2	45	15.8	64.9

Оценка доли выноса N и P из среды позволила скорректировать рекомендуемые начальные концентрации этих биогенных элементов. Питательная среда ВВМ 3N содержит $123.6 \text{ мг N} \cdot \text{л}^{-1}$ и $53.2 \text{ мг P} \cdot \text{л}^{-1}$. Результаты двух экспериментов показали, что *S. rubescens* в условиях лабораторного культивирования при освещенности 7000 Лк и барботировании газовой воздушной (CO_2 до 0.2 % v/v) смесью предпочитает среду, более богатую азотом и менее – фосфором, по сравнению с ВВМ 3N. Учитывая долю выноса биогенных элементов из питательной среды за 9 суток в варианте № 9

эксперимента № 1, можно рассчитать начальные концентрации N и P, достаточные для получения активно растущей зеленой культуры *S. rubescens*:

$$C_N = 220 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot 98.2 \% = 216.0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1},$$

$$C_P = 45 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot 64.9 \% = 29.2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1},$$

или, округленно, 215 мг N·л⁻¹ и 30 мг P·л⁻¹.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода построения обобщенного параметра оптимизации позволило оптимизировать рецептуру питательной среды для I «зеленой» стадии лабораторного культивирования *S. rubescens* при искусственном освещении 7000 Лк. Эксперименты показали возможность замены в питательной среде ВВМ для этого вида нитратов на более дешевый источник азота – карбамид. При рекомендованных концентрациях N и P в среде (215 мг N·л⁻¹ и 30 мг P·л⁻¹) максимальные и средние удельные скорости роста на обеих формах азота сходны и составляют: $\mu_{\text{макс.}} - 1,39 - 1,57 \text{ сут}^{-1}$, $\mu_{\text{ср}} - 0,54 - 0,56 \text{ сут}^{-1}$.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность с. н. с., к. б. н. В. И. Холодову за консультации по вопросам планирования эксперимента и обработки полученных результатов.

Список литературы

1. Костиков И. Ю. О составе почвенных водорослей Горного Крыма (Украина) / И. Ю. Костиков, Т. М. Дариенко // Альгология. – 1996. – 6, № 3. – С. 285-294.
2. Солоненко А. Н. Почвенные водоросли типчаково-ковыльной степи заповедника Аскания-Нова (Украина) / А. Н. Солоненко, И. Ю. Костиков // Альгология. – 1995. – 5, № 1. – С. 59-64.
3. Šramková K. Výskit cyanobaktérií a rias v nárastoch «lampenflóry» v šiestich sprístupnených jaskyniach na Slovensku / K. Šramková, L. Kováčik // Bull. Slov. Bot. Spoločn., Bratislava. – 2005. – 27. – P. 17-21.
4. Минюк Г. С. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н. В. Данцюк, Э. С. Челебиева // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. – С. 67-78.
5. Чубчикова И. Н. Влияние состава среды на содержание вторичных каротиноидов у микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae) / И. Н. Чубчикова // Морск. экол. журн.. – 2012. – 11, № 4. – С. 95-101.
6. Чубчикова И. Н. Вторичный каротиногенез у зелёной микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в условиях природных освещённости и температуры / И. Н. Чубчикова, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 81: Управление биосинтезом гидробионтов. – С. 77-81.
7. Чубчикова И. Н. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов / И. Н. Чубчикова, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, Н. В. Данцюк // Экология моря. – 2009. – Вып. 77. – С. 77-83.
8. Адлер Ю. П. Планирование эксперимента при поиске оптимальных условий. / Ю. П. Адлер, Е. В. Маркова, Ю. В. Грановский. – М.: Наука, 1976. – 281 с.
9. Костіков І. Ю. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори) / І. Ю. Костіков, П. О. Романенко, Е. М. Демченко, Т. М. Дарієнко, Т. І. Михайлов, О. В. Рибчинський, А. М. Солоненко. – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.

10. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С.Дж. Перт. – М.: Мир, 1978. – 374 с.
11. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution / A. R. Wellburn // J. Plant Physiol. – 1994. – **144**. – P. 307-313.
12. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 119 с.

Чубчикова І. М. Оптимізація складу живильного середовища для вирощування мікроводорості *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae) / І.М. Чубчикова, Г.С. Мінюк, І.В. Дробецька, Н.В. Данцюк // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 196-205.

Досліджено процес зростання вегетативної культури зеленої мікроводорості *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. у живильних середовищах із різними комбінаціями початкових концентрацій азота у мінеральній (нітрат натрію) та органічній (карбамід) формах і фосфора. Результати двох експериментів оброблено методом побудови узагальненого параметра оптимізації, що об'єднує середню та максимальну питому швидкість росту, середню продуктивність культур, вміст сухої речовини на клітину, а також масову долю хлорофілу *a* та сумарних первинних каротиноїдів. Показано, що поєднання середніх концентрацій азота (незалежно від природи його джерела) та фосфора забезпечують високі значення продукційних характеристик культур *S. rubescens*. Врахування частки винесення азота і фосфора із живильного середовища дозволяє розрахувати їх початкові концентрації, що є логістичними для одержання активно зростаючої зеленої культури скотієллопсіса - 215 мг N·л⁻¹ і 30 мг P·л⁻¹.

Ключові слова: *Scotiellopsis rubescens*, узагальнений параметр оптимізації, швидкість росту, суха речовина, пігменти.

OPTIMIZATION OF NUTRIENT MEDIUM FOR GROWING OF THE MICROALGAE *SCOTIELLOPSIS RUBESCENS* VINATZ. (CHLOROPHYCEAE)

Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V.

Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Science of Ukraine, Sevastopol, Crimea, Ukraine
E-mail: chubchikova@mail.ru

This work is included in the series of experiments concerning the methods recommended for laboratory cultivation of commercially suitable species of green algae which are able to synthesize ketocarotenoid astaxanthin under two-stage batch culture. The results of two experiments aimed at studying the growth process of vegetative culture of green microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. 1975 (Scenedesmales) in BBM medium with various combinations of the initial concentrations of nitrogen (in the form of sodium nitrate or urea), and phosphorus, are presented. Concentrations have been set in the range 40 – 400 mg N·l⁻¹ and 10 – 80 mg P·l⁻¹.

The experimental data have been processed using the method of the multiple response optimization which integrates such parameters of crop state of *S. rubescens* as the average and maximum specific growth rates ($\mu_{N\ av}$ and $\mu_{N\ max}$), the average productivity of crops ($P_{N\ av}$), the dry matter content per cell (DM), and the mass percentage of major pigments – chlorophyll *a* (Chl*a*, % DM) and total carotenoids (Σ CR, % DM). The experiments have shown that *S. rubescens* grows well on the medium both inorganic (NaNO₃), and organic ((NH₂)₂CO) nitrogen source: average values of the culture growth characteristics for each experiment vary insignificantly. Nevertheless, high concentrations of nitrate slightly inhibit

the growth of *S. rubescens*, whereas the effect of high concentrations of urea is positive. Effect of initial concentrations of nitrogen (both nitrate and urea) and phosphorus in the medium on the content of DM per cell of *S. rubescens* was insignificant, but the mass percentage of Chla and Σ CR at high and middle nitrogen concentrations was 2 - 3 times higher than that at low concentration.

It has been shown that a combination of middle concentrations of nitrogen (regardless of its source) and phosphorous provides high values of crop production characteristics of *S. rubescens* ($\mu_{N\text{ av}} = 0.540 - 0.564 \text{ day}^{-1}$, $\mu_{N\text{ max}} = 1.569 - 1.388 \text{ day}^{-1}$, $P_{N\text{ av}} = 4.02 \cdot 10^6 - 4.95 \cdot 10^6 \text{ cell} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) with a satisfactory state of the cells (DM = 65.97 – 92.22 pg·cell⁻¹, Chla = 1.26 – 1.34 %DM, Σ CR = 1.33 – 1.55 % DM).

An estimation of nitrogen and phosphorus removal percentage from the nutrient medium allows the initial concentrations of these nutrients which are sufficient for active growth of green culture of *S. rubescens* to be corrected as 215 mg N·l⁻¹ and 30 mg P·l⁻¹.

The experiments have shown the possibility of replacing of sodium nitrate in the BBM medium for *S. rubescens* with cheaper urea.

Keywords: *Scotiellopsis rubescens*, multiple response optimization, growth rate, dry matter, pigments.

References

1. Kostikov I.Yu., Darienko T.M., To the species composition of soil algae of Mountain Crimea (Ukraine), *Algologia*, **6**(3), 285 (1996).
2. Solonenko A.N., Kostikov I.Yu., Soil algae of the stipa-festuka steppe of Askania-Nova reserve (Ukraine), *Algologia*, **5**(1), 59 (1995).
3. Šramková K., Kováčik L., Occurrence of cyanobacteria and algae in growth of «lampiflora» in the six show caves of Slovakia, *Bull. Slov. Bot. Spoločn., Bratislava*, **27**, 17 (2005).
4. Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Chubchikova I.N., Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S., Screening of green microalgae as potential source of nature ketocarotenoids. The relevance, strategy and study approach, *Ecologiya morya*, **80**, 67 (2010).
5. Chubchikova I.N., Effect of medium composition on the content of secondary carotenoids in microalgae *Scotiellopsis rubescens* (Chlorophyceae), *Marine Ecological Journal*, **XI**(4), 95 (2012).
6. Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Secondary carotenogenesis in green microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. under natural insolation and temperature, *Ecologiya morya*, **81**, 77 (2010).
7. Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V., Chlorococcal microalgae as source of natural secondary carotenoids, *Ecologiya morya*, **77**, 77 (2009).
8. Adler Yu.P., Markova E.V., Granovskiy Yu.V. *Design of Experiments in Search of Optimal Conditions*, 281 p. (Moscow, Nauka, 1976).
9. Kostikov I.Yu., Romanenko P.A., Demchenko E.N., Darienko T.M., Mihailuk T. I., Rybchynsky O.V., Solonenko A. M. *Algae in Soils of Ukraine: History and Methods of Studies, System, and List of the Algal Flora*, 300 p. (Fitosotsiotsentr, Kiev, 2001).
10. Pirt S.J. *Principles of microbe and cell cultivation*, 363 p. (Blackwell Sci. Publ., 1975).
11. A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution, *J. Plant Physiol.*, **144**, 307 (1994).
12. *Methods of Hydrochemical Research of Basic Nutrients*, 119 p. (Moscow: VNIRO, 1988).

Поступила в редакцию 02.12.2013 г.