

УДК 581.1:57.032:57.033

РОСТ *TETRASELMIS VIRIDIS* ROUCH. В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УГЛЕРОДНОМ ОБЕСПЕЧЕНИИ

Жондарева Я. Д., Тренкениу Р. П., Горбунова С. Ю.

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей
имени А. О. Ковалевского РАН», Севастополь, Россия
E-mail: yana.zhondareva@yandex.ru

В работе представлены результаты экспериментального исследования роста черноморской флагелляты *Tetraselmis* (= *Platymonas*) *viridis* (Rouchijajnen) R. E. Norris, Hori & Chihara, 1980, штамм IBSS-25 в альгологически чистой накопительной культуре при различных способах обеспечения углеродом. Способ подачи углерода в культуру в виде барботажа атмосферным воздухом существенно влияет на скорость роста культуры *T. viridis* и связан со скоростью растворения углекислого газа в среде, которая увеличивается с уменьшением объема пузырьков при использовании распылителя. В культуре с распылителем скорость роста более, чем в 2 раза выше по сравнению с обычной трубкой диаметром 2 мм при равной скорости подачи воздуха в культуры. Показано, что накопительная культура *T. viridis* может достигать высокой продуктивности ($0,47 \text{ г АСВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) на участке светозависимого линейного роста при отсутствии углеродного лимитирования.

Ключевые слова: микроводоросли, *Tetraselmis* (= *Platymonas*) *viridis*, накопительная культура, скорость роста, абсолютно сухой вес (=АСВ), углеродное питание.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы стала бурно развиваться аквакультура ценных пород рыб, появилась потребность в пигментах и полиненасыщенных жирных кислотах, которые стимулируют рост и выживаемость личинок рыб, повышают качество конечной продукции [1]. К наиболее перспективным источникам биологически ценных продуктов из микроводорослей относятся морские виды [2]. Они особенно богаты полиненасыщенными жирными кислотами [1–4]. Вместе с тем медицинские исследования показали важную роль полиненасыщенных жирных кислот для здоровья человека, особенно $\omega 3$ и $\omega 6$ кислот [5–7].

Одним из объектов, перспективных для промышленного производства и практического использования можно рассматривать морские одноклеточные водоросли рода *Tetraselmis* = *Platymonas* [8]. Черноморская флагеллята *Tetraselmis viridis* Rouch. впервые описана [9] и выделена в культуру из Черного моря [10]. Эта микроводоросль предложена в качестве перспективного объекта массового культивирования как корма для объектов аквакультуры [11]. Устойчивый непрерывный рост *T. viridis* был получен в хемостате на тихоокеанской воде, что позволило авторам изучить некоторые физиологические характеристики [12]. На основе экспериментов с элементами минерального питания клеток была разработана питательная среда для *Tetraselmis. viridis*, позволяющая получать

устойчивый непрерывный рост микроводоросли в плотной культуре [13]. Реализация интенсивного роста невозможна без достаточного обеспечения клеток минеральным или органическим углеродом. При этом источники углерода должны быть недорогими.

В предлагаемой статье сделана оценка продукционных характеристик культуры микроводоросли *Tetraselmis viridis* при использовании питания клеток углеродом из воздуха и глицерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект. В опытах использовали альгологически чистую культуру *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara, 1980 [8] – штамм IBSS-25 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН».

Питательная среда. Питательная среда, состав которой представлен в таблице 1, готовилась на основе пастеризованной черноморской воды. Вода имела соленость 1,4 - 1,8 ‰ и находилась в диапазоне оптимальных значений [11, 13].

Таблица 1.

Состав среды для культивирования *T. viridis*

Компонент	Количество, г/л
1. NaNO_3	1,8
2. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,3
3. Na_2EDTA	0,037
4. $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,042
5. $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,008
6. $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,00625
7. $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,00183
8. $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$	0,00238

Данная питательная среда рассчитана на достижение плотности культуры до 4–6 г (сухой биомассы)/л; при работе с пониженными или повышенными плотностями, концентрации всех элементов следует пропорционально изменить.

T. viridis выращивали накопительным методом в двух стеклянных культиваторах плоскопараллельного (слой 2 см) типа [16], с рабочим объемом 1 л при боковом поверхностном освещении 10 кЛк. Освещенность поверхности фотобиореакторов определяли люксметром Ю-116. С целью компенсации испарения воды, на протяжении всего эксперимента поддерживали этот объем, доливая перед измерениями дистиллированную воду до отметки 1 л. Скорость продувки воздухом через трубку или распылители в культуре составляла $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$. Температура среды автоматически поддерживалась на уровне 27–30 °С, которую контролировали ртутным термометром непосредственно в культиваторе. Для засева экспериментальных культиваторов использовали активно делящуюся культуру, начальная плотность которой составила 0,23 г/л сухого вещества.

Оптическую плотность рассчитывали по формуле: $D = -\lg(T)$, где T – величина пропускания, определяемая на Unico 2100 (United Products & Instruments, USA) при длине волны 750 нм, абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышала 1,0 %. Параллельно аналогичные измерения производили с помощью прибора КФК2. Показания плотности на разных приборах не выявили различий, превышающих абсолютную погрешность. При пересчёте единиц оптической плотности на сухой вес микроводорослей (АСВ) использовали эмпирически определённый коэффициент k , равный $0,9 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \text{ ед.опт.пл.}^{-1}$. Определение плотности по сухому весу и подсчет концентрации клеток в камере Горяева производили в пятикратной повторности по методикам, описанным в работе [18]. Микроскопический контроль культуры производили с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss, Германия). Математическую обработку и моделирование экспериментальных данных осуществляли с помощью компьютерных программ «Grapher3» и «Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте испытывали рост культуры микроводоросли *Tetraselmis viridis* при трех различных вариантах углеродного питания культуры. В первом варианте опыта источником углерода служил обычный воздух, подаваемый в культуру компрессором через барботажную трубку с распылителем на конце. Накопительная кривая роста плотности культуры и концентрации клеток показана на рисунке 1. За весь эксперимент, который длился 13 суток, плотность культуры увеличилась от 0,23 до 2,96 г (АСВ)/л, т.е. более чем в 12 раз.

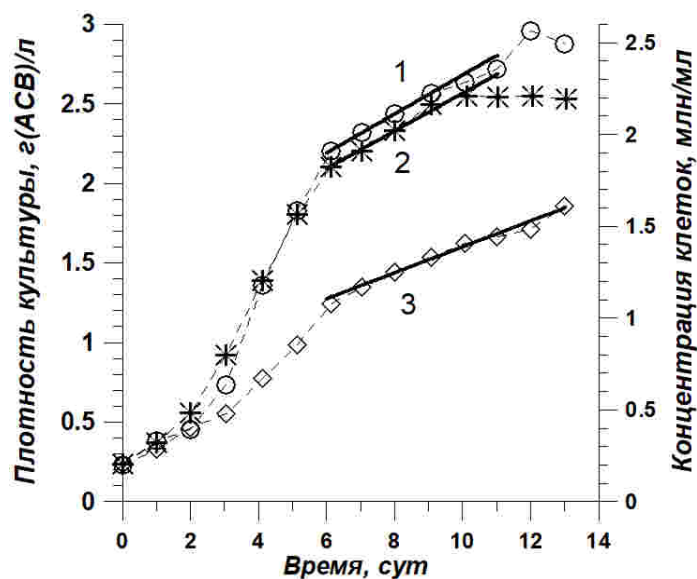


Рис. 1. Динамика роста *Tetraselmis viridis* при различных формах подачи в культуру воздуха – источника углерода. 1 – распылитель, 2 – распылитель + глицерин, 3 – обычная барботажная трубка $\varnothing = 2$ мм. Скорость подачи воздуха одинакова.

Второй вариант опыта отличался тем, что в питательную среду дополнительно был добавлен глицерин в количестве 5,575 г/л. Эта добавка практически не повлияла на рост платимонаса как при низкой, так и высокой концентрации клеток, а некоторые различия в росте лежат в области достоверности измерений (95 %).

В третьем варианте углеродное питание подавали без распылителя на конце барботажной трубки. На рисунке видно, что в этом случае культура росла медленнее по сравнению с 1 и 2 вариантом.

В качестве визуальной иллюстрации плотности культуры первого варианта опыта на рисунке 2 приведены фотографии культиватора на 2 и 4 сутки выращивания микроводорослей.

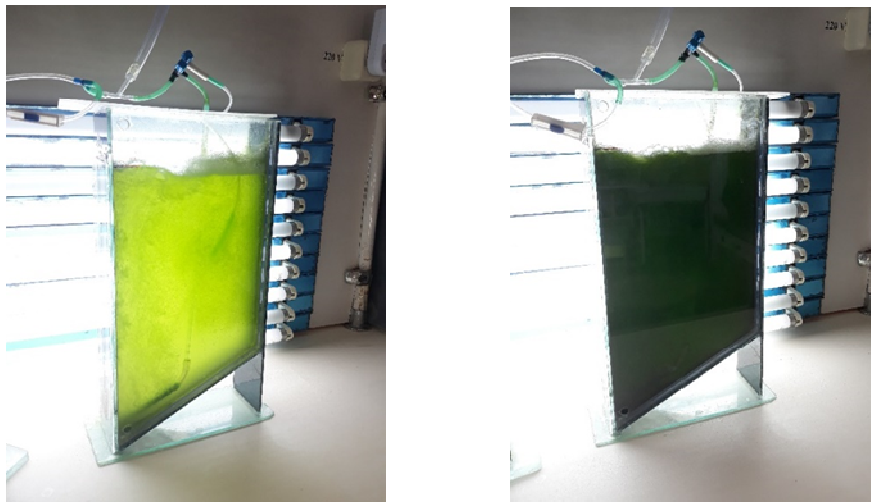


Рис. 2. Фото культиватора в первом опыте на 2 и 4 сутки. (Фото Я. Д. Жондаревой)

Полученные экспериментальные результаты позволяют количественно оценить не только ростовые характеристики *T. viridis*, но и указать на точки смены лимитирующих факторов, определяющих динамику развития культуры [18]. Первые двое суток происходит адаптация культуры к внешним условиям, в первую очередь, к световым, клетки не затевают друг друга и рост практически не отличается во всех трех вариантах.

С помощью анализа накопительных кривых методом линейных сплайнов можно описать динамику роста на отдельных участках роста культуры *T. viridis* и найти коэффициенты уравнений, что позволит дать количественную оценку различий роста в разных вариантах углеродного обеспечения клеток.

С третьих суток начинается линейный рост [18, 19] во всех вариантах опытных культур. Постоянство скорости роста (P_m) наблюдается вплоть до шестых суток. На этом промежутке времени (2–6 сут.) зависимость плотности культуры (B) от

времени (t) линейного роста хорошо ($R_{sq}=0,99$) описываются уравнениями прямой [18, 19]:

$$\begin{aligned} 2 \leq t \leq 6, \\ {}^1B \langle z \cdot l^{-1} \rangle = P_{m1}t - b_1 = 0,47 \langle z \cdot l^{-1} cym^{-1} \rangle t \langle cym \rangle - 0,65 \langle z \cdot l^{-1} \rangle, \\ {}^2B \langle z \cdot l^{-1} \rangle = P_{m2}t - b_1 = 0,47 \langle z \cdot l^{-1} cym^{-1} \rangle t \langle cym \rangle - 0,65 \langle z \cdot l^{-1} \rangle, \\ {}^3B \langle z \cdot l^{-1} \rangle = P_{m3}t - b_1 = 0,22 \langle z \cdot l^{-1} cym^{-1} \rangle t \langle cym \rangle - 0,14 \langle z \cdot l^{-1} \rangle. \end{aligned} \quad (1)$$

Из уравнений видно, что на данном промежутке времени скорости роста (P_m) в варианте с распылителем не различаются ($P_{m1}=P_{m2}$), т.е. добавка глицерина в среде не влияет на продуктивность *T. viridis* и определяется только световыми условиями, связанными с увеличением плотности и коэффициента поглощения света культурой [19].

Сравнивая уравнения для 1 и 3 вариантов опыта, можно видеть, что несмотря на одинаковые скорости подачи воздуха в культуры, скорость роста *T. viridis* более, чем в два раза выше при наличии распылителя. Это связано с тем, что распылитель увеличивает растворимость атмосферного углекислого газа в культуральной среде, а его отсутствие, наоборот, приводит к уменьшению и лимитированию скорости роста культуры углеродом.

На 6 сутки во всех вариантах опыта происходит перелом кривых роста культуры, что указывает на смену лимитирующего фактора, определяющего скорость роста. При этом наблюдается также линейный рост, который для 1–2 варианта заканчивается на 10–11 сутки, а для третьего варианта длится до конца опыта. Количественно эти участки накопительной кривой хорошо ($R_{sq}=0,99$) описываются уравнениями:

$$\begin{aligned} {}^1B \langle z \cdot l^{-1} \rangle = P_{m1}t + b_1 = 0,12 \langle z \cdot l^{-1} cym^{-1} \rangle t \langle cym \rangle + 1,46 \langle z \cdot l^{-1} \rangle, \\ {}^2B \langle z \cdot l^{-1} \rangle = P_{m2}t + b_1 = 0,12 \langle z \cdot l^{-1} cym^{-1} \rangle t \langle cym \rangle + 1,48 \langle z \cdot l^{-1} \rangle, \\ {}^3B \langle z \cdot l^{-1} \rangle = P_{m3}t + b_1 = 0,08 \langle z \cdot l^{-1} cym^{-1} \rangle t \langle cym \rangle + 0,79 \langle z \cdot l^{-1} \rangle. \end{aligned} \quad (2)$$

Графически отрезки прямых, описываемых этими уравнениями, показаны сплошными линиями на рисунке 1. Как видим, скорость роста на этом участке постоянна, но снизилась почти в 4 раза. Причем в 1 и 2 варианте скорость роста одинакова, т.е. дополнительный органический источник углерода в виде глицерина клетками не используется. Объяснить такую смену лимитирующего фактора со светового на углеродный можно тем, что с ростом плотности снижается удельное обеспечение клеток углеродом.

Третий вариант иллюстрирует смену лимитирования скорости роста общим потоком углерода в культуру при невысокой плотности, на лимитирование скорости удельным потоком углерода в клетку при повышенной плотности культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучен рост черноморской флагелляты *Tetraselmis viridis* в накопительной культуре при различных способах обеспечения клеток углеродом. Добавление углерода в виде глицерина в культуру микроводоросли практически не влияет на ее ростовые и продукционные характеристики ни на стадии светового, ни на стадии углеродного лимитирования роста культуры.
2. Предложена модель в виде линейных сплайнов для описания динамики роста на разных участках накопительной культуры *T. viridis*.
3. Способ подачи углерода в культуру в виде барботажа атмосферным воздухом существенно влияет на скорость роста культуры *Tetraselmis viridis* и связан со скоростью растворения углекислого газа в среде. Которая увеличивается с уменьшением объема пузырьков с помощью обычного аквариумного распылителя. Таким образом, в культуре с распылителем скорость роста выше более чем в 2 раза по сравнению с обычной трубкой при равной скорости подачи воздуха в микроводорослевые культуры.
4. Экспериментально показано, что накопительная культура *T. viridis* может достигать высокой продуктивности ($0,47 \text{ г АСВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) на участке светозависимого линейного роста при отсутствии углеродного лимитирования.
5. Отмечено, что при достижении плотности культуры *Tetraselmis viridis* около $2,1 \text{ г АСВ} \cdot \text{л}^{-1}$ наступает перелом в характере накопительной культуры. Происходит смена фактора, лимитирующего скорость роста. Падение продуктивности почти в 4 раза обусловлено тем, что резко снижается обеспеченность клеток углеродом.
6. Без использования распылителя на конце барботажной трубки переход к лимитированию роста за счет снижения удельной обеспеченности клеток углеродом наступает при плотности культуры около $1,2 \text{ г АСВ} \cdot \text{л}^{-1}$. Продуктивность снижается с $0,22$ до $0,08 \text{ г АСВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

Работа выполнена согласно госзадания "Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса" (№ 0556-2021-0004).

Список литературы

1. Kleivdal H. Industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA rich raw material in fish feed / H. Kleivdal, M. S. Chauton, K. I. Reitan // Basis, knowledge status and possibilities. – 2013. – Bergen: SINTEF. – 88 p.
2. Pulz O. Valuable products from biotechnology of microalgae / O. Pulz, W. Gross // Appl Microbiol Biotechnol. – 2004. – Vol. 65 (6). – P. 635–648.
3. Griffiths M. J. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions / M. J. Griffiths, R. P. van Hille, S. T. L. Harrison // J. Appl Phycol. – 2012. – Vol. 24. – P. 989–1001.
4. Wenjia Gu. Towards a sustainable supply of omega-3 fatty acids: Screening microalgae for scalable production of eicosapentaenoic acid (EPA) / Gu. Wenjia, John M. Kavanagh, Dale D. McClure. // Algal Research. – 2021 (in press).

5. Bucher H. C. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials / H. C. Bucher, P. Hengstler, C. Schindler, G. Meier. // *Am. J. Med.* – 2002. – Vol. 112(4). – P. 298–304.
6. Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits / J. Whelan. // *J. Nutr.* – 2009. – Vol. 139(1). – P. 5–10.
7. Ulmann L. Microalgal fatty acids and their implication in health and disease medicinal / L. Ulmann, V. Blanckaert, V. Mimouni, M. X. Andersson, B. Schoefs, B. Chenaïs. // *Chemistry.* – 2017. – Vol. 17. – P. 1112–1123.
8. Guiry M. D. *Algae Base* / M. D. Guiry, G. M. Guiry. – 2019.
9. Роухияйнен М. И. Новый вид рода *Platymonas* (Chlorophyta) из зеленых водорослей. / Новости систематики низших растений / М. И. Роухияйнен. – М.: Наука, 1966. – С. 82–85.
10. Ланская Л. А. Культивирование водорослей / Л. А. Ланская. // *Экологическая физиология морских планктонных водорослей.* – Киев: Наукова думка, 1971. – С. 5–21.
11. Спекторова Л. В. Морская флагеллята *Platymonas viridis* (Rouch.) как объект для массового культивирования / Л. В. Спекторова. // *Докл. АН СССР.* – 1970. – Т. 192, вып. 3. – С. 662–665.
12. Силкин В. А. Непрерывная культура морской водоросли *Platymonas viridis* / В. А. Силкин, В. Н. Белянин, Л. А. Паутова. // *Биология моря.* – 1977. – Т. 1 – С. 73–77.
13. Тренкеншу Р. П. Плотные культуры морских микроводорослей / Р. П. Тренкеншу, И. А. Терсков, Ф. Я. Сидько. // *Изв. СО АН СССР (серия Биология).* – 1981. – Т. 15, вып. 3. – С. 75–82.
14. Knowless J. A method for the large-scale culture of algae / J. Knowless, L. Edwards. // *Underwater J.* – 1971. – Vol. 3 (3). – P. 163–165.
15. Fon Sing S. Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: A novel protocol for commercial microalgal biomass production / S. Fon Sing, A. Isdepsky, M. A. Borowitzka, D. M. Lewis // *Bioresour. Technol.* – 2014. – Vol. 161. – P. 47–54.
16. Тренкеншу Р. П. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей / Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков, А. Б. Боровков, Т. М. Новикова // *Вопросы современной альгологии.* – 2017. – Т. 1, вып. 13.
17. Владимирова М. Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей / М. Г. Владимирова, В. Е. Семененко. – М: АН СССР. – 1962. – 60 с.
18. Лелеков А. С. Моделирование световых кривых фотосинтеза линейными сплайнами / А. С. Лелеков, Р. П. Тренкеншу // *Экология гидросферы.* – 2019. – Т. 2, вып. 4. – С. 20–29.
19. Тренкеншу Р. П. Линейный рост морских микроводорослей в культуре / Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков, Т. М. Новикова // *Морской биологический журнал.* – 2018. – Т. 3, вып. 1. – С. 53–60.

GROWTH OF *TETRASELMIS VIRIDIS* ROUCH. IN BATCH CULTURE WITH DIFFERENT CARBON SUPPLY

Zhondareva Ya. D., Trenkenshu R. P., Gorbunova S. Yu.

«A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS», Sevastopol, Russia
E-mail: yana.zhondareva@yandex.ru

One of the promising objects for industrial production and practical use can be considered marine unicellular algae of the genus *Tetraselmis* = *Platymonas*. Sustained continuous growth of *Tetraselmis viridis* was obtained in a chemostat on the Pacific water. Based on experiments with elements of mineral nutrition of cells, a nutrient media for *T. viridis* was developed to obtain stable continuous growth of microalgae in dense

culture. Implementation of intensive growth is impossible without sufficient supply of cells with mineral or organic carbon. At the same time, carbon sources should be inexpensive.

In the proposed paper, an assessment of the production characteristics of the microalgae culture of *Tetraselmis viridis* was made using carbon nutrition from the air and glycerol.

The results of an experimental research of growth of the Black Sea flagellate *Tetraselmis* (= *Platymonas*) *viridis* (Rouchijajnen) R. E. Norris, Hori & Chihara, 1980, strain IBSS-25 in an algologically pure batch culture under various methods of carbon supply are presented. To describe the growth dynamics in individual areas of growth of culture *T. viridis* the analysis of accumulative curves by the linear spline method was carried out. The coefficients of the equations were found to quantify the differences of growth in different variants of the carbon supply of cells. A model in the form of linear splines is proposed to describe the dynamics of growth in different areas of the batch culture of *T. viridis*. In the experiments, it was not possible to detect a noticeable effect on the growth of the culture of the addition of organic carbon (in the form of glycerol) to the nutrient media, neither at the stage of light, nor at the stage of carbon limitation of culture growth. The method of supplying carbon to the culture in the form of atmospheric air bubbling significantly affects on the growth rate of the culture *T. viridis*, and is associated with the rate of dissolution of carbon dioxide in the media, which increases with a decrease in the volume of bubbles when an aquarium sprayer is used. In culture with a sprayer, the growth rate is more than 2 times higher compared to a conventional tube with a diameter of 2 mm at the same air supply rate to the cultures. It has been shown, batch culture of *T. viridis* can achieve high productivity ($0,47 \text{ g ADW} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) in the area of light-dependent linear growth under the absence of carbon limitation. When a density of culture of about $2,1 \text{ gADW} \cdot \text{l}^{-1}$ is reached, a change occurs in the nature of the batch culture, a change occurs in the factor that limits the growth rate. The drop in productivity by almost 4 times is due to the fact that the specific supply of cells with carbon is sharply reduced. Without the use of a sprayer at the end of the bubble tube, the transition to growth limitation due to a decrease in the specific supply of cells with carbon occurs at a culture density of about $1,2 \text{ gADW} \cdot \text{l}^{-1}$. Productivity decreases from $0,22$ to $0,08 \text{ g ADW} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$.

Keywords: microalgae, *Tetraselmis* (= *Platymonas*) *viridis*, batch culture, growth rate, absolutely dry weight (=ADW), carbon nutrition.

References

1. Kleivdal H., Chauton M. S., Reitan K. I., Industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA rich raw material in fish feed, *Basis, knowledge status and possibilities*, 88 (Bergen: SINTEF, 2013).
2. Pulz O., Gross W., Valuable products from biotechnology of microalgae, *Appl Microbiol Biotechnol.*, **65**, 635 (2004).
3. Griffiths M. J., van Hille R. P., Harrison S. T. L., Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions, *J. Appl Phycol.*, **24**, 989 (2012).
4. Wenjia Gu., Kavanagh J. M., McClure D. D. Towards a sustainable supply of omega-3 fatty acids: Screening microalgae for scalable production of eicosapentaenoic acid (EPA), *Algal Research* (2021).

5. Bucher H. C., Hengstler P., Schindler C., Meier G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Am. J. Med.*, **112**, **4**, 298 (2002).
6. Whelan J. Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits, *J. Nutr.*, **139**, **1**, 5 (2009).
7. Ulmann L., Blanckaert V., Mimouni V., Andersson M. X., Schoefs B., Chenais B. Microalgal fatty acids and their implication in health and disease medicinal, *Chemistry*, **17**, 1112 (2017).
8. Guiry M. D., Guiry G. M., *Algae Base* (2019).
9. Roukhiyainen M. I. A new species of the genus *Platymonas* (Chlorophyta) from green algae, *News of taxonomy of lower plants*, 82 (M.: Science, 1966).
10. Lanskaya L. A. Cultivation of algae, *Ecological physiology of marine planktonic algae*, 5 (Kiev: Scientific thought., 1971).
11. Spektorova L. V. Marine flagellate *Platymonas viridis* (Rouch.) as an object for mass cultivation, *Report Academy of Sciences of the USSR*, **192**, **3**, 662 (1970).
12. Silkin V. A., Belyanin V. N., Pautova L. A. Continuous culture of seaweed *Platymonas viridis*, *Biology of the sea*, **1**, 73 (1977).
13. Trenkenshu R. P., Terskov I. A., Sidko F. Ya. Dense cultures of marine microalgae, *Newsletter Siberian Branch of the USSR Academy of Sciences (Biology series)*, **15**, **3**, 75 (1981).
14. Knowless J., Edwards L. A method for the large-scale culture of algae, *Underwater J.*, **3**, **3**, 163 (1971).
15. Fon Sing S., Isdepsky A., Borowitzka M. A., Lewis D. M. Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis* sp. in raceway ponds under increasing salinity: A novel protocol for commercial microalgal biomass production, *Bioresour. Technol.*, **161**, 47 (2014).
16. Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Borovkov A. B., Novikova T. M. Unified setup for laboratory research of microalgae, *Issues of Modern Algology*, **1**, 13 (2017).
17. Vladimirova M. G., Semenenko V. E. Intensive culture of unicellular algae, 60 (M: USSR Academy of Sciences, 1962).
18. Lelekov A. S., Trenkenshu R. P. Modeling of light curves of photosynthesis by linear splines, *Ecology of the hydrosphere*, **2**, **4**, 20 (2019).
19. Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Novikova T. M. Linear growth of marine microalgae in culture, *Marine biological journal*, **3**, **1**, 53 (2018).