

УДК 581.1:57.032:57.033

## ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕТЕРОТРОФНОГО РОСТА *PHAEODACTYLUM* *TRICORNUTUM* ВОHLIN В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Жондарева Я. Д., Тренкенишу Р. П.

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 гетеротрофного роста черноморской диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* штамм IBSS-25 в альгологически чистой накопительной культуре. Получено устойчивое размножение клеток и рост плотности культуры при добавлении в питательную среду 4 г/л глицерина и полном отсутствии освещения. Такая начальная концентрация глицерина позволила обеспечить прирост концентрации клеток около 0,5 млн кл/мл за 6 суток эксперимента, а экономический коэффициент составил 125 тыс. кл./г(глицерина). Анализ накопительной кривой в виде линейной модели показал постоянство скорости роста концентрации клеток на уровне 110 тысяч клеток/л в сутки. Кривая роста плотности культуры *Ph. Tricornutum* позволила выделить 2 участка: экспоненциальный – с постоянной максимальной удельной скоростью роста 0,32 сут<sup>-1</sup>, и линейный – с максимальной продуктивностью 0,135 г(АСВ) л<sup>-1</sup> сут<sup>-1</sup>. В эксперименте экономический коэффициент производства биомассы *Ph. tricornutum* за счет использования глицерина составил 0,305 г(АСВ)/г(глицерина). КПД преобразования энергосодержания глицерина в химическую энергию биомассы можно оценить в 35,5 %.

**Ключевые слова:** морские микроводоросли, *Phaeodactylum tricornutum*, гетеротрофия, накопительная культура, скорость роста, абсолютно сухой вес (=АСВ), глицерин.

### ВВЕДЕНИЕ

К настоящему времени разработаны различные способы культивирования микроводорослей. В зависимости от практических целей производства биомассы используют фотоавтотрофный, гетеротрофный, фотогетеротрофный и миксотрофный режимы выращивания [1]. Чаще всего, микроводоросли выращиваются фотоавтотрофно путем фиксации растворенного в питательной среде углекислого газа за счет энергии поглощенного света. В то же время некоторые виды микроводорослей могут расти гетеротрофно, используя органические соединения в составе среды в качестве источников углерода и энергии; поэтому они не нуждаются в свете в качестве источника энергии [2]. Гетеротрофный рост представляет собой аэробный процесс, при котором ассимиляция органических субстратов генерирует энергию путем окислительного фосфорилирования, сопровождаемого потреблением кислорода для обеспечения конечного акцептования электронов. Миксотрофный рост представляет собой одновременное использование неорганического и органического источников углерода в присутствии света [3], поэтому фотоавтотрофия и гетеротрофия происходят

одновременно [1]. Некоторые виды способны переключаться с фотоавтотрофного на гетеротрофный рост и обратно [3].

По сравнению с традиционным фотоавтотрофным культивированием, гетеротрофный способ выращивания микроводорослей имеет как преимущества, так и недостатки. Существенным недостатком является восприимчивость гетеротрофных культур к микробиальному загрязнению [4]. Главным достоинством гетеротрофии является возможность получения более высокой объёмной плотности биомассы в культуре и не требуют высокого соотношения освещаемой поверхности к объёму. По данным [5–8] гетеротрофный рост обеспечивает высокую плотность клеток, которая может превышать 75 г/л, поскольку рост не ограничен светом, а продукция микроводорослей с единицы объёма культуры в десятки раз выше, чем при фотоавтотрофии. Кроме того, при гетеротрофном культивировании значительно увеличивается содержание липидов в биомассе клеток, что повышает ценность получаемой биомассы [9, 10].

Источником энергии и углерода при гетеротрофном росте в отсутствие света могут служить различные органические соединения. Чаще всего используют глюкозу, глицерин, ацетаты, а также отходы различных производств в виде сточных вод, содержащих органику, что значительно снижает стоимость получаемой микроводорослевой продукции [11]. Гетеротрофные микроводоросли пользуются преимуществами своих автотрофных аналогов (за исключением фиксации CO<sub>2</sub>) без ограничения продуктивности в зависимости от света. Это демонстрируется путем сравнения их производительности. Для фотоавтотрофной системы самая высокая концентрация биомассы, достигнутая на сегодняшний день, составляет 40 г/л сухой клеточной массы в тонкослойных (8 мм) культурах с концентрированной подачей CO<sub>2</sub> [12], в то время как, наиболее продуктивная гетеротрофная (на примере роста *Chlorella vulgaris* на глюкозе) достигла плотности биомассы 117,2 г/л [13].

В предлагаемой работе представлены результаты исследования возможности гетеротрофного роста *Phaeodactylum tricornerutum* и его количественных характеристик скоростей, а также оценка энергетического и экономического коэффициента использования глицерина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали альгологически чистую культуру диатомовой микроводоросли *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin, 1897 [14, 15] – штамм IBSS-25 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН». Питательная среда, состав которой представлен в работе [16], готовилась на основе пастеризованной черноморской воды соленостью 1,4–1,8 ‰. Для обеспечения гетеротрофного питания [17] в среду был добавлен глицерин в концентрации 4 г/л.

*Ph. tricornerutum* выращивали накопительным методом в стеклянном культиваторе плоскопараллельного (слой 2 см) типа [16], с рабочим объёмом 1 л. Для компенсации испарения воды, на протяжении всего эксперимента поддерживали этот объём, доливая перед измерениями дистиллированную воду до отметки 1 л. Скорость продувки воздухом через распылители в культуре составляла 1л·мин<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup>.

Температура среды автоматически поддерживалась на уровне 19° С, и параллельно ее контролировали ртутным термометром непосредственно в культиваторе. Для засева экспериментальных культиваторов использовали активно делящуюся культуру, начальная плотность которой составила 0,23 г/л сухого вещества.

Определение плотности и подсчет концентрации клеток в камере Горяева производили в десятикратной повторности по методикам, описанным в работе [16]. 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 гетеротрофный рост микроводоросли *Ph. tricornutum* в накопительной культуре при использовании глицерина в качестве единственного энергетического субстрата. Накопительная кривая роста концентрации клеток показана на рисунке 1.

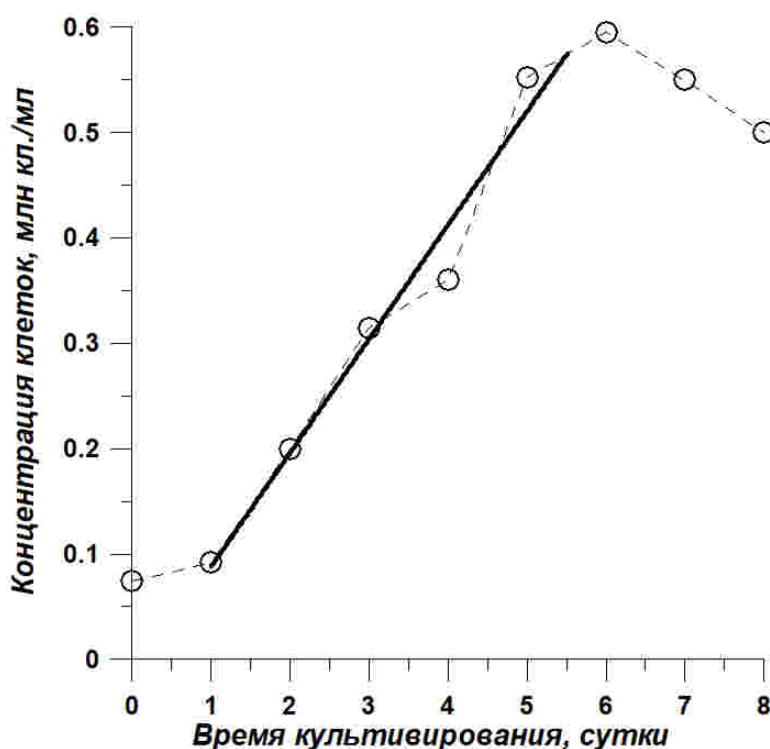


Рис 1. Динамика концентрации клеток *Phaeodactylum tricornutum* при использовании глицерина (4 г/л) как источника энергии в отсутствие света. Светлые кружочки – экспериментальные данные. Сплошная прямая – модель линейного роста культуры (1).

Приведенные на этом рисунке данные показывают, что после суточной адаптации начинается пятисуточный рост культуры за счет деления клеток, при этом их концентрация увеличивается в шесть раз от 100 до 600 тысяч в 1 мл культуры, т.е. прирост составил 0,5 млн кл./мл. Считая, что за 5 суток роста глицерин в среде полностью исчерпан, можно оценить его расход на прирост клеток, т.е. за счет одного грамма глицерина можно вырастить примерно 125 млн клеток *Ph. tricornutum*.

*Скорость роста концентрации клеток.* Рассматривая форму накопительной кривой, можно заметить практически линейный рост концентрации клеток со временем. Используя модель линейного роста микроводорослей для аккумулятивной культуры, можно рассчитать скорость роста ( $P_n$ ), применив уравнение для зависимости концентрации клеток ( $N$ ) от времени ( $t$ ):

$$N = P_n(t - t_{st}) - N_{st}, t_{st} \leq t \leq t_f,$$

$$P_n = \frac{N + N_{st}}{t - t_{st}}.$$

Уравнение справедливо в диапазоне времени роста от начала ( $t_{st}$ ) до конца ( $t_f$ ) линейной фазы.  $N_l$  – коэффициент, ограничивающий применимость уравнения для концентрации клеток. Количественно уравнение хорошо (коэффициент детерминации  $R_{sq} = 0,98$ ) описывает экспериментальные данные и позволяет вычислить скорость роста:

$$N \langle \text{млн кл} \cdot \text{л}^{-1} \rangle = 0,11 \langle \text{млн кл} \cdot \text{л}^{-1} \text{сут}^{-1} \rangle (t - 1) \langle \text{сут} \rangle - 0,02 \langle \text{млн кл} \cdot \text{л}^{-1} \rangle,$$

$$P_N = 0,11 \langle \text{млн кл} \cdot \text{л}^{-1} \text{сут}^{-1} \rangle.$$

(1)

Таким образом, экспериментально показана принципиальная возможность гетеротрофного размножения клеток *P. tricornutum* на глицерине со скоростью около 110 тысяч клеток/л в сутки. Полученные данные могут быть полезны при использовании этой микроводоросли в качестве живого корма в аквакультуре, где рацион питания обычно измеряют в концентрациях клеток.

Параллельные измерения динамики плотности культуры в эксперименте представлены на рисунке 2.

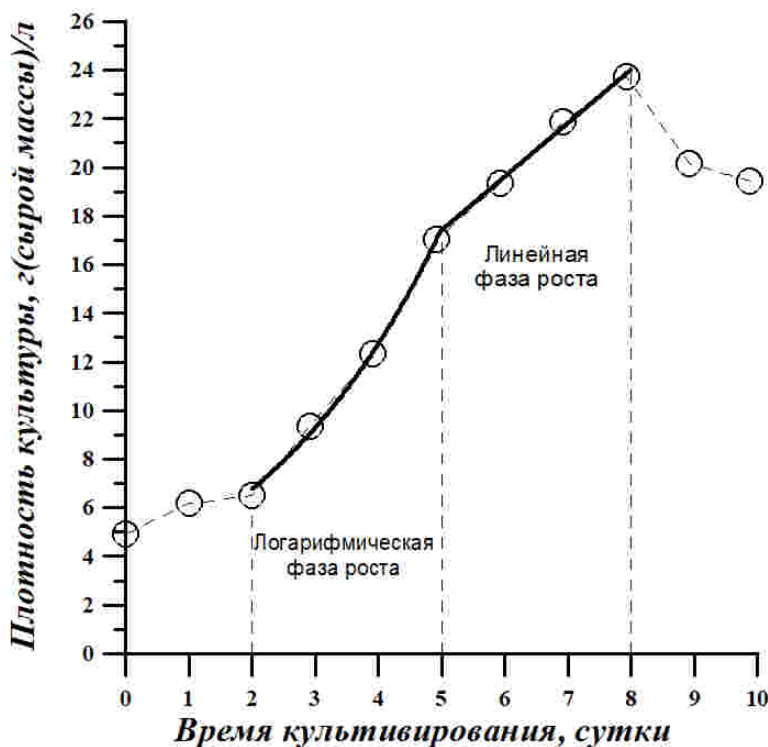


Рис. 2. Динамика плотности культуры *Phaeodactylum tricornerutum* при использовании глицерина (4 г/л) как источника энергии в отсутствие света. Светлые кружочки – экспериментальные данные, выраженные в концентрациях сырого веса. Сплошные линии – экспоненциальная (2) и линейная (3) модели роста культуры.

Сравнивая графики роста культуры микроводоросли, изображенные на рисунке 1 и рисунке 2, можно заметить, что динамика размножения и накопления биомассы имеют существенные различия. Так, размножение клеток практически заканчивается к шестым суткам культивирования, а концентрация биомассы продолжает увеличиваться вплоть до восьмых суток. Кроме того, лаг-период оканчивается к концу вторых суток, в отличие от накопительной кривой роста концентрации клеток, которые начинают размножаться к концу первых суток. Еще одним отличием является экспоненциальный рост биомассы от вторых по пятые сутки культивирования, что указывает на максимальную удельную скорость роста биомассы, которая увеличивается с 6 до 17 г/л, а прирост составляет 11 г/л за трое суток. Начиная с пятых суток, культура переходит в линейную фазу роста, которая также длится трое суток, но прирост составляет только 7 г/л (от 17 до 24 г/л).

*Удельная скорость роста.* Форма накопительной кривой плотности культуры позволяет выделить два участка роста, которые можно количественно описать в виде конкретных уравнений с постоянными параметрами скоростей. На экспоненциальной фазе наблюдается постоянство удельной скорости, а динамика

роста плотности ( $W$ ) описывается показательным уравнением, из которого находим удельную скорость роста ( $\mu$ ):

$$W = W_{st} e^{\mu(t-t_{st})}, t_{st} \leq t \leq t_f,$$

$$\mu = \frac{\ln W - \ln W_{st}}{(t - t_{st})}, t_{st} \leq t \leq t_f.$$

Для участка накопительной кривой в экспоненциальной фазе роста (2-5 сутки) данные хорошо ( $R_{sq} = 0,997$ ) описываются уравнением:

$$W = 3,6 \langle \text{г/л} \rangle e^{0,32 \langle 1/\text{сут} \rangle (t-2) \langle \text{сут} \rangle}, 2 \leq t \leq 5. \quad (2)$$

В результате сделана оценка максимальной удельной скорости роста *Ph. tricornutum* в данных условиях культивирования, которая равна  $0,32 \text{ сут}^{-1}$ .

*Скорость роста (продуктивность)*. Начиная с 5 суток, плотность культуры изменяется со временем практически линейно. Эта линейная фаза роста длится трое суток, а рост плотности может быть описан уравнением прямой, из которого находим максимальную продуктивность ( $P_w$ ):

$$W = P_w (t - t_{st}) - W_{st}, t_{st} \leq t \leq t_f,$$

$$P_w = \frac{W + W_{st}}{t - t_{st}}, t_{st} \leq t \leq t_f.$$

Для участка накопительной кривой на линейной фазе роста (5-8 сутки) данные хорошо ( $R_{sq} = 0,993$ ) описываются уравнением:

$$W \langle \text{г/л} \rangle = 2,21 \langle \text{г/л} \cdot \text{сут} \rangle (t - 5) \langle \text{сут} \rangle - 6,47 \langle \text{г/л} \rangle, 5 \leq t \langle \text{сут} \rangle \leq 8,$$

$$P_w = 2,21 \langle \text{г/л} \cdot \text{сут} \rangle, 5 \leq t \langle \text{сут} \rangle \leq 8. \quad (3)$$

Таким образом, в опыте при данных условиях культивирования была достигнута продуктивность *Ph. tricornutum*, равная  $2,21 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ .

Для сравнительных оценок роста микроводорослей в культуре чаще всего используют измерения плотности культуры в единицах абсолютно сухой массы или веса (АСВ). Одновременные измерения сухой ( $B$ ) и сырой массы ( $W$ ) показаны на рисунке 3.

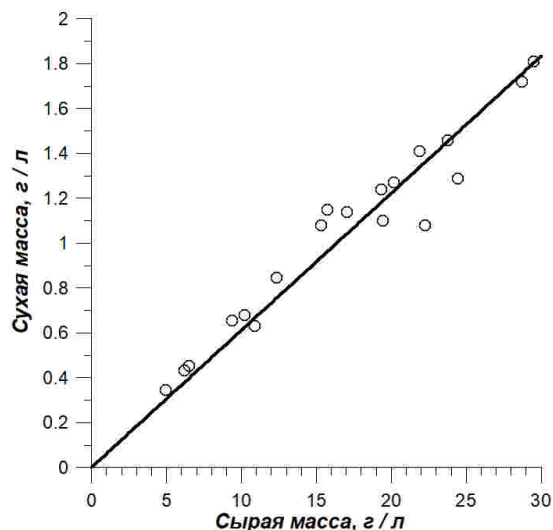


Рис. 3. Соотношение между сырой и сухой биомассой *Ph. tricornutum*. Светлые кружочки – одновременные экспериментальные измерения плотности культуры. Сплошная линия – расчет по уравнению (4).

Полученные данные с хорошей точностью ( $R_{sq}=0,990$ ) позволили обнаружить прямолинейную связь между сухим и сырым весом биомассы:

$$B = kW,$$

$$k = 0,061 \frac{z(ACB)}{z}. \quad (4)$$

Таким образом, доля абсолютно сухого вещества в сырой биомассе *Ph. tricornutum* составляет 6,1 %.

*Оценка экономического коэффициента.* Данные позволяют дать примерную оценку расхода глицерина на прирост единицы биомассы *Ph. tricornutum*. Общий прирост биомассы составил около 20 г/л, или 1,22 г(АСВ)/л. Учитывая, что к 8 суткам рост прекратился, можно считать, что весь глицерин был ассимилирован. Экономический коэффициент составляет  $1,22:4=0,305$  г(АСВ)/г(глицерина). Оценка этого показателя по числу клеток составляет примерно 135 млн кл./г(глицерина).

*Энергетическая оценка усвоения глицерина.* Калорийность глицерина 4,3 ккал/г. Добавка в питательную среду 4 г/л глицерина соответствует 17,2 ккал/л. При калорийности биомассы около 5 ккал/г(АСВ) микроводорослей общее энергосодержание культуры составит около 6,1 ккал/л, что соответствует энергетическому КПД:

$$6,1:17,2 = 0,355 = 35,5 \%$$

Полученная величина значительно превышает максимальное значение КПД фотобиосинтеза.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследование гетеротрофного роста черноморской диатомеи *Phaeodactylum tricorutum* в накопительной культуре позволило получить устойчивое размножение клеток и рост плотности культуры при добавлении в питательную среду 4 г/л глицерина и полном отсутствии освещения. Такая начальная концентрация органического субстрата позволила обеспечить прирост концентрации клеток около 0,5 млн кл/мл за 6 суток эксперимента, а экономический коэффициент составил 125 тыс. кл./г(глицерина).
2. Анализ полученной накопительной кривой с помощью линейной модели показал постоянство скорости роста концентрации клеток на уровне 110 тысяч клеток/л в сутки.
3. Кривая роста плотности культуры *Ph. tricorutum* позволила выделить 2 участка: экспоненциальный – с постоянной максимальной удельной скоростью роста 0,32 сут<sup>-1</sup>, и линейный – с максимальной продуктивностью 0,135 г(АСВ) л<sup>-1</sup>сут<sup>-1</sup>.
4. В эксперименте экономический коэффициент производства биомассы *Ph. tricorutum* за счет использования глицерина составил 0,305 г(АСВ)/г(глицерина).
5. Таким образом, КПД преобразования энергосодержания глицерина в химическую энергию биомассы можно оценить в 35,5 %.

*Работа выполнена в рамках 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. Wang J. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects / J. Wang, H. Yang, F. Wang // Appl Biochem Biotechnol. – 2014. – Vol. 172 – P. 3307–3329.
2. Chen G. Q. Growing phototrophic cells without light / G. Q. Chen, F. Chen // Biotechnol Lett. – 2006. – Vol. 28. – P. 607–616.
3. Kang R. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus* sp. / R. Kang, J. Wang, D. Shi, W. Cong, Z. Cai, F. Ouyang // Biotechnol Lett. – 2004. – Vol. 26. – P. 1429–1432.
4. Perez-Garcia O. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics / O. Perez-Garcia, Y. Bashan // Algal Biorefineries A. Prokop et al. (eds.), Springer International Publishing Switzerland. – 2015. – P. 61–130.
5. Smythers A. L. Direct incorporation of exogenous glycerol leads to increased triacylglycerol formation in *Chlorella vulgaris* / A. L. Smythers, E. G. Napier, E. L. Higginbotham, A. T. Holland, A. A. Stephenson, D. R. J. Kolling // Energy & fuels. – 2019. – Vol. 33, No 11. – P. 11125–11134.
6. Deore P. Perspective on the current status of approaches for early detection of microalgal grazing / P. Deore, J. Beardall, S. Noronha // Springer Nature. – 2020.
7. Ruiz J. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy / J. Ruiz, R. H. Wijffels, M. Dominguez, M. J. Barbosa // Algal Research. – 2022.
8. Scaife M. A. Algal biofuels in Canada: Status and potential / M. A. Scaife, A. Merckx-Jacques, D. L. Woodhall, R. E. Armenta // Renewable and sustainable energy reviews. – 2015. – Vol. 44. – P. 620–642.



9. Bastos C. R. V. Optimisation of biomass production and nutritional value of two marine diatoms (Bacillariophyceae), *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros calcitrans* / C. R. V. Bastos, I. B. Maia, H. Pereira, J. Navalho, J. C. S. Varela // *Biology*. – 2022. – Vol. 11. – P. 594.
10. Barros A. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae / A. Barros, H. Pereira, J. Campos, A. Marques, J. Varela, J. Silva // *Sci. Rep.* – 2019. – Vol. 9.
11. Mehariya S. Integrated approach for wastewater treatment and biofuel production in microalgae biorefineries / S. Mehariya, R. K. Goswami, P. Verma, R. Lavecchia, A. Zuorro // *Energies*. – 2021. – Vol. 14.
12. Doucha J. Production of high-density chlorella culture grown in fermenters / J. Doucha, K. Lívanský // *J. Appl. Phycol.* – 2012. – Vol. 24. – P. 35–43.
13. Doucha J. Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate / J. Doucha, K. Lívanský // *J Appl Phycol.* – 2006. – Vol. 18. – P. 811–826.
14. Bohlin von K. Zur morphologie und biologie einzelliger algen / von K. Bohlin // *Öfversigt af Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar, Stockholm*. – 1897. – Vol. 54, No 9. – P. 507–529.
15. Kociolek J. P. DiatomBase. *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin 1897 / J. P. Kociolek, S. Blanco, M. Coste, L. Ector, Y. Liu, B. Karthick, M. Kulikovskiy, N. Lundholm, T. Ludwig, M. Potapova, F. Rimet, K. Sabbe, S. Sala, E. Sar, J. Taylor, B. Van de Vijver, C. E. Wetzel, D. M. Williams, A. Witkowski, J. Witkowski // *World Register of Marine Species*. – 2022.
16. Жондарева Я. Д. Рост *Tetraselmis viridis* Rouch. в накопительной культуре при различном углеродном обеспечении / Я. Д. Жондарева, Р. П. Тренкеншу, С. Ю. Горбунова // *Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия*. – 2022. – Т. 8, № 1. – С. 95–103.
17. Stukolova I. V. The main types of algae nutrition (short glossary) / I. V. Stukolova, R. P. Trenkenshu // *Voprosy sovremennoi algologii (Issues of modern algology)*. – 2020. – Vol. 22, No 1. – P. 34–38.
18. 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.
19. Жондарева Я. Д. Миксотрофный рост *Phaeodactylum tricorutum* на неорганической среде с глюкозой и глицерином в накопительной культуре / Я. Д. Жондарева // *Морские биологические исследования: достижения и перспективы: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием в 3 томах // ЭКОСИ-гидрофизика*. – 2016. – Т. 3 – С. 378–381.
20. Тренкеншу Р. П. Линейный рост морских микроводорослей в культуре / Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков, Т. М. Новикова // *Морской биологический журнал*. – 2018. – Т. 3, № 1. – С. 53–60.

## CHARACTERISTICS OF HETEROTROPHIC GROWTH OF *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* IN BATCH CULTURE

*Zhondareva Ya. D., Trenkenshu R. P.*

*Federal Research Center "Institute of Biology of the Southern Seas named after A. O. Kovalevsky of the Russian Academy of Sciences", Sevastopol, Russia  
E-mail: yana.zhondareva@yandex.ru*

To date, various methods for cultivating of microalgae have been developed. Depending on the practical goals of biomass production, photoautotrophic, heterotrophic, photoheterotrophic, and mixotrophic growing regimes are used. Most often, microalgae are grown photoautotrophically by fixing of carbon dioxide dissolved in the nutrient medium due to the energy of absorbed light. At the same time, some species of

microalgae can grow heterotrophically, using organic compounds in the media as sources of carbon and energy; therefore they do not need light as an energy source.

The paper presents the results of an experimental study of the heterotrophic growth of the Black Sea diatom *Phaeodactylum tricorutum* strain IBSS-25 in an algologically pure batch culture. A stable cell multiplication and an increase in culture density were obtained with the addition of 4 g/l of glycerin to the nutrient medium and the complete absence of lighting. Such an initial concentration of glycerol made it possible to ensure an increase in the concentration of cells of about 0.5 million cell/ml for 6 days of the experiment, and the economic coefficient was 125 thousand cell/g (glycerol). Analysis of the batch curve in the form of a linear model showed the constancy of the growth rate of the cell concentration at the level of 110 thousand cells/l per day. The growth curve of the density of the *Ph. tricorutum* culture made it possible to distinguish 2 areas: exponential – with a constant maximum specific growth rate of 0,32 day<sup>-1</sup>, and linear – with a maximum productivity of 0,135 g (ADW) l<sup>-1</sup>day<sup>-1</sup>.

Thus, the fundamental possibility of heterotrophic reproduction of *Ph. tricorutum* cells on glycerol at a rate of about 110 thousand cells/L per day has been experimentally demonstrated.

The data obtained allow us to give an approximate estimate of the consumption of glycerol for the growth of a unit of biomass *Ph. tricorutum*. The total increase in biomass was about 20 g/l, or 1.22 g(ASV)/l. The estimate of this indicator by the number of cells is approximately 135 million cells/g (glycerol). In the experiment, the economic coefficient of biomass production of *Ph. tricorutum* through the use of glycerol was 0,305 g (ADW)/g (glycerol).

The efficiency of conversion of the energy content of glycerol into chemical energy of biomass can be estimated at 35.5 %.

**Keywords:** marine microalgae, *Phaeodactylum tricorutum*, heterotrophy, accumulative culture, growth rate, absolutely dry weight (= ADW), glycerol.

## References

1. Wang J., Yang H. and Wang F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **172**, p. 3307 (2014).
2. Chen G. Q. and Chen F. Growing phototrophic cells without light, *Biotechnol. Lett.*, **28**, p. 607 (2006).
3. Kang R., Wang J., Shi D., Cong W., Cai Z. and Ouyang F. Interactions between organic and inorganic carbon sources during mixotrophic cultivation of *Synechococcus* sp., *Biotechnol. Lett.*, **26**, p. 1429 (2004).
4. Perez-Garcia O. and Bashan Y. Microalgal heterotrophic and mixotrophic culturing for bio-refining: From metabolic routes to techno-economics, *Algal Biorefineries* (Springer International Publishing Switzerland, 2015), p. 61.
5. Smythers A. L., Napier E. G., Higginbotham E. L., Holland A. T., Stephenson A. A. and Kolling D. R. J. Direct incorporation of exogenous glycerol leads to increased triacylglycerol formation in *Chlorella vulgaris*, *Energy & fuels*, **33** (11), p. 11125 (2019).
6. Deore P., Beardall J. and Noronha S. Perspective on the current status of approaches for early detection of microalgal grazing, *Nature* (2020).
7. Ruiz J., Wijffels R. H., Dominguez M. and Barbosa M. J. Heterotrophic vs autotrophic production of microalgae: Bringing some light into the everlasting cost controversy, *Algal Research* (2022).
8. Scaife M. A., Merckx-Jacques A., Woodhall D. L. and Armenta R. E. Algal biofuels in Canada: Status and potential, *Renewable and sustainable energy reviews*, **44**, p. 620 (2015).

9. Bastos C. R. V., Maia I. B., Pereira H., Navalho J. and Varela J. C. S. Optimisation of biomass production and nutritional value of two marine diatoms (Bacillariophyceae), *Skeletonema costatum* and *Chaetoceros calcitrans* *Biology*, **11**, p. 594 (2022).
10. Barros A., Pereira H., Campos J., Marques A., Varela J. and Silva J. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae, *Sci. Rep.*, **9** (2019).
11. Mehariya S., Goswami R. K., Verma P., Lavecchia R. and Zuorro A. Integrated approach for wastewater treatment and biofuel production in microalgae biorefineries, *Energies*, **14** (2021).
12. Doucha J. and Lívanský K. Production of high-density chlorella culture grown in fermenters, *J. Appl. Phycol.*, **24**, p. 35 (2012).
13. Doucha J. and Lívanský K. Productivity, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate, *J. Appl. Phycol.*, **18**, p. 811 (2006).
14. Bohlin von K. Zur morphologie und biologie einzelliger algen, *Öfversigt af Kongliga Svenska Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar, Stockholm*, **54** (9), p. 507 (1897).
15. Kociolek J. P., Blanco S., Coste M., Ector L., Liu Y., Karthick B., Kulikovskiy M., Lundholm N., Ludwig T., Potapova M., Rimet F., Sabbe K., Sala S., Sar E., Taylor J., Van de Vijver B., Wetzel C. E., Williams D. M., Witkowski A. and Witkowski J. DiatomBase. *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin 1897, *World Register of Marine Species* (2022).
16. Zhondareva Ya. D., Trenkenshu R. P. and Gorbunova S. Yu. Growth of *Tetraselmis viridis* Rouch. in batch culture with different carbon supply, *Scientific notes of the Crimean Federal University names V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **8** (1), p. 95 (2022).
17. Stukolova I. V. and Trenkenshu R. P. The main types of algae nutrition (short glossary), *Issues of modern algology*, **22** (1), p. 34 (2020).
18. Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Borovkov A. B. and Novikova T. M. Unified setup for laboratory research of microalgae, *Issues of Modern Algology*, **13** (1), (2017).
19. Zhondareva Ya. D. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* on an inorganic medium with glucose and glycerol in batch culture, *Marine biological research: achievements and prospects: collection of materials of the All-Russian scientific and practical conference with international participation in 3 volumes: ECOSI-hydrophysics*, **3**, p. 378 (2016).
20. Trenkenshu R. P., Lelekov A. S. and Novikova T. M. Linear growth of marine microalgae in culture, *Marine biological journal*, **3** (1), p. 53 (2018).