

УДК 582.263.1-114.3:57.04

ОЦЕНКА ПРОДУКЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ *SCENEDESMUS RUBESCENS* ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТИ БИОГЕННЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ

© 2026 г. С. Ю. Горбунова, А. Б. Боровков, Р. П. Тренкеншу

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,

Севастополь, Российская Федерация

E-mail: svetlana_8423@mail.ru

Поступила в редакцию 18.12.2024; после доработки 17.04.2025;
принята к публикации 21.11.2025.

Биотехнология микроводорослей рассматривается как перспективное направление для получения возобновляемых источников биомассы, богатой белками, липидами и пигментами, что делает актуальным поиск оптимальных условий их культивирования. Представители рода *Scenedesmus* Meyen, 1829 отличаются быстрым ростом, устойчивостью к изменениям внешней среды и значительным содержанием биологически активных соединений, что определяет их высокий потенциал для применения в пищевой, фармацевтической и энергетической отраслях. Целью настоящей работы было проанализировать параметры роста и содержания фотосинтетических пигментов в культуре *Scenedesmus rubescens* (P. J. L. Dangeard) E. Kessler, M. Schafer, C. Hummer, A. Kloboucek & V. A. R. Huss, 1997, выращиваемой на трёх типах минеральных питательных сред — на полной среде Тамия, её половинной модификации (Тамия $\frac{1}{2}$) и среде Болда (Bold's basal medium, BBM) (варианты № 1, 2 и 3 соответственно). В рамках исследования микроводоросли *S. rubescens* культивировали в условиях дополнительной подачи углекислого газа и непрерывного освещения в течение 16 сут. Отмечена высокая удельная скорость роста культуры (μ) на питательных средах BBM и Тамия — 0,48 и 0,49 сут⁻¹ соответственно. При использовании среды Тамия $\frac{1}{2}$ удельная скорость роста *S. rubescens* была ниже — 0,33 сут⁻¹. Линейный рост микроводорослей на трёх питательных средах наблюдали по 4-е сутки включительно. За этот период плотность *S. rubescens* в вариантах опыта № 1 и 3 увеличилась практически в 7 раз, в варианте № 2 — в 3,7 раза. Максимальная продуктивность *S. rubescens* для трёх вариантов эксперимента составляла 0,35, 0,18 и 0,31 г сухой массы·л⁻¹·сут⁻¹, при этом каких-либо изменений в морфологической структуре клеток обнаружено не было. Выявлены значимые различия в биохимических и кинетических характеристиках роста *S. rubescens*, культивируемых на трёх разных питательных средах. Высокие концентрации хлорофилла *a* и *b* зафиксированы в клетках микроводорослей, выращенных на средах Тамия и BBM. Полученные в эксперименте результаты свидетельствуют об очень близких ростовых характеристиках культуры *S. rubescens* в вариантах № 1 и 3 в диапазоне экспоненциальной и линейной фаз роста, что позволяет подобрать условия, способные обеспечить на среде BBM продуктивность и накопление ценных веществ, аналогичные таковым для варианта на среде Тамия.

Ключевые слова: *Scenedesmus rubescens*, питательная среда Болда, питательная среда Тамия, накопительная культура, продуктивность, фотосинтетические пигменты

Биотехнология микроводорослей способна внести значительный вклад в решение глобальных проблем, связанных с растущим населением Земли, загрязнением окружающей среды, сокращением запасов ископаемого топлива и потребностью в устойчивых пищевых и энергетических ресурсах. Использование микроводорослей, являющихся возобновляемым источником целого комплекса биологически активных веществ, со множеством потенциальных способов их применения, открывает огромные возможности для инноваций. Иными словами, микроводоросли привлекают внимание благодаря многофункциональности получаемой продукции и значительному потенциалу своего использования в различных отраслях промышленности (в мелиорации, в производстве БАДов, кормов, топлива и косметики) [Levasseur et al., 2020; Suresh, Benor, 2020].

Скорость роста микроводорослей позволяет получать огромное количество биомассы (в 10–20 раз больше, чем биомасса кукурузы или сои на единицу площади) с высоким содержанием белков, пигментов, липидов и микроэлементов. Биохимическим составом биомассы можно управлять, изменяя физико-химические параметры среды обитания. Представители рода *Scenedesmus* Meyen, 1829 из класса Chlorophyceae часто встречаются в пресноводных водоёмах. Эти неподвижные колониальные зелёные микроводоросли, состоящие из клеток около 8 мкм в ширину и 14 мкм в длину, обладают высокой питательной ценностью. Многие виды этого рода используются по всему миру в разнообразных коммерческих проектах благодаря своему быстрому росту, простоте выращивания и способности адаптироваться к различным условиям окружающей среды.

Питательная ценность зелёных микроводорослей рода *Scenedesmus* обусловлена высоким содержанием белка, полиненасыщенных жирных кислот, витаминов и биологически активных соединений [Chu, 2012]. При этом каждый вид характеризуется своим соотношением липидов, углеводов и белков [Nur et al., 2014]. *Scenedesmus rubescens* (P. J. L. Dangeard) E. Kessler, M. Schafer, C. Hummer, A. Kloboucek & V. A. R. Huss, 1997 был использован в качестве модельного организма для производства бета-каротина, омега-3 — жирных кислот и глицерина [Jo et al., 2020], которые играют важную роль в борьбе с различными заболеваниями, включая сердечно-сосудистые патологии, хронические воспаления, атеросклероз и рак, а также в борьбе с процессами старения.

Биомасса *Scenedesmus* богата хлорофиллами и каротиноидами, которые способны значительно улучшить общее состояние организма человека и животных. Эти пигменты эффективно действуют как ингибиторы роста микроорганизмов и антиоксиданты, а также поддерживают зрение, иммунную систему и здоровье кожи. Кроме того, они имеют большое значение в пищевой промышленности, поскольку расширяют возможности производства функциональных продуктов и улучшают их нутритивный профиль [Fan et al., 2013; Guedes et al., 2013; Ishaq et al., 2016; Patil, Kaliwal, 2019]. Благодаря такой особенности микроводоросли *Scenedesmus* обладают значительным коммерческим потенциалом для применения в медицине и в пищевой и косметической промышленности. Также биомасса *Scenedesmus* является одним из основных живых кормов, обеспечивающих правильное развитие водных организмов — коловраток, представителей зоопланктона, личинок рыб и креветок [Руденко, Ткачева, 2021; Mayeli et al., 2004].

Однако следует принимать во внимание, что массовое производство микроводорослей сопряжено с преодолением множества препятствий. Одна из проблем — высокая стоимость макро- и микроэлементов для приготовления культуральных сред: на неё, согласно данным [Fasaei et al., 2018], приходится около 34 % от общей стоимости производства, при этом затраты на сбор урожая составляют 20–30 %. Если проблемы со сбором урожая возможно решить, используя эффективные и малозатратные методы, такие как флокуляция [Rahman et al., 2022], то для снижения себестоимости производства водорослей по-прежнему актуален поиск продуктивной, устойчивой и экономически приемлемой питательной среды. Результаты большого количества экспериментальных исследований, в том числе наших собственных, показали, что у представителей

рода *Scenedesmus* можно значительно увеличить скорость роста при частичной или полной замене минеральных составляющих питательных сред на сточные воды [Ishaq et al., 2016; Muluye et al., 2021]. Это позволяет существенно сократить затраты на приготовление питательных сред для выращивания микроводорослей. При этом полученную подобным способом биомассу в большинстве случаев целесообразно использовать для извлечения ценных веществ и для удобрения сельскохозяйственных культур либо же в качестве кормовой добавки для животных (человеку употреблять её нельзя) [Горбунова, Гудвилевич, 2020; Горбунова, Зубко, 2010].

Тот факт, что при организации производства микроводорослей значимым показателем выступает не только продуктивность, но и качество получаемого урожая, является основанием для поиска оптимальной питательной среды для *Scenedesmus*. На сегодняшний день в литературе описаны различные типы питательных сред, активно используемых во всём мире для культивирования микроводорослей семейства Scenedesmaceae. Это среды Успенского, Болда (Bold's basal medium, BBM), Чу-10, Чу-13, Тамия, Тамия ½, Сетлик и BG-11. Несмотря на то, что все эти среды пригодны для выращивания *Scenedesmus*, скорость роста культуры, урожайность и содержание пигментов могут значительно отличаться из-за разного состава и концентрации химических соединений, применяемых для приготовления питательных сред.

Таким образом, ряд преимуществ — быстрый рост, высокая концентрация антиоксидантов и физиологическая пластичность — делает представителей *Scenedesmus* перспективными объектами биотехнологии. Однако реализация коммерческого потенциала возможна лишь за счёт совершенствования стратегий и оптимизации параметров культивирования микроводорослей, что остаётся главной задачей исследователей. Целью настоящей работы было проанализировать ростовые характеристики и содержание пигментов в культуре *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta: Scenedesmaceae, Scenedesmus), выращиваемой на трёх минеральных средах — Тамия, Тамия ½ и BBM.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использована зелёная микроводоросль *S. rubescens*, штамм IBSS-91 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ (Севастополь). Микроводоросли выращивали на трёх питательных средах: Тамия [Tamiya, 1957], Тамия ½ [Hase et al., 1957; Sandmann et al., 2022] и BBM [Bischoff, Bold, 1963] (далее — варианты № 1, 2 и 3 соответственно). Среды отличаются друг от друга не только составом и уровнем концентрации химических соединений, но и стоимостью (табл. 1).

Для каждого варианта эксперимент проводили в трёх повторностях. Питательные среды готовили на основе дистиллированной воды. Предварительно в течение 5 сут *S. rubescens* адаптировали к каждой среде. Микроводоросли выращивали в стеклянных культиваторах плоскопараллельного типа толщиной 5 см [Тренкеншу и др., 2017]. Рабочий объём культиватора составлял 3 л. Освещение культуры было круглосуточным; использовали световую решётку из люминесцентных ламп мощностью 18 Вт. Интенсивность освещения на поверхности фотобиореакторов регистрировали измерителем LI-250A с пирометрическим датчиком (Li-COR, США). Средняя освещённость — 10 кЛк. Барботаж культур осуществляли воздухом с помощью аквариумного компрессора Hailea ACO-308. Средняя скорость подачи воздуха составляла около 1 л·л⁻¹ культуры в минуту (с дополнительной подачей углекислого газа для стабилизации pH и внесения источника углерода в среду). Оптимальный уровень pH в культиваторах, 6,5–7, поддерживали с помощью pH-контроллера (Aqua Medic, Германия). Температуру стабилизировали в диапазоне +28...+30 °С. На протяжении всего эксперимента в культиваторах поддерживали заданный объём воды; испарение компенсировали, доливая один раз в сутки перед измерениями дистиллированную воду до отметки 3 л. В среднем объём долива составлял 60 мл.

Таблица 1. Средняя рыночная стоимость минеральных питательных сред для промышленного культивирования *Scenedesmus rubescens***Table 1.** Average market cost of mineral nutrient media for industrial cultivation of *Scenedesmus rubescens*

Химическое соединение	Цена за 1 кг, руб.	Цена реактива для приготовления 1000 л среды, руб.		
		Среда Тамия	Среда Тамия ½	Среда BBM
NaNO ₃	285	–	–	71,25
KNO ₃	357	1785	892,5	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	134	335	167,5	10,05
NaCl	95	–	–	2,38
K ₂ HPO ₄	693	–	–	52
KH ₂ PO ₄	534	667,5	333,75	93,45
CaCl ₂ ·2H ₂ O	172	–	–	4,3
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	790	29,2	14,6	39,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	433	1,3	0,65	2,15
KOH	254	–	–	7,85
H ₃ BO ₃	344	0,98	0,5	0,39
MnCl ₂ ·4H ₂ O	865	1,57	0,78	1,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	365	0,08	0,04	3,25
MoO ₃	2500	0,04	0,02	1,8
NH ₄ VO	9400	0,22	0,11	–
CuSO ₄ ·5H ₂ O	555	–	–	0,87
Co(NO ₃) ₂ ·5H ₂ O	2376	–	–	1,16
Всего		2822	1411	292

Для засева экспериментальных культиваторов использовали предварительно адаптированную к определённой среде культуру с начальной плотностью 0,16 г сухой массы·л⁻¹.

Для оценки плотности культуры применяли оптический метод. Оптическую плотность культуры микроводорослей (D) рассчитывали по формуле:

$$D = -\lg(T), \quad (1)$$

где T — величина пропускания, определяемая на фотометре Unicо при длине волны 750 нм, в кюветах с рабочей длиной 0,5 см (абсолютная погрешность не превышала 1,0 %).

Кюветы располагали максимально близко к фотоприёмнику для уменьшения влияния светорассеяния на показания прибора.

Пересчёт единиц оптической плотности на сухую массу (CM) микроводорослей проводили в соответствии с уравнением:

$$CM = k \times D_{750}, \quad (2)$$

где k — эмпирически определённый коэффициент, равный 0,77 г·л⁻¹·ед. опт. пл.⁻¹.

Для расчёта k отбирали серию проб из всех экспериментальных культиваторов. Серия состояла минимум из трёх повторностей по 15 мл каждая. Для каждой пробы проводили параллельные измерения оптической плотности (D) и сухой массы. Перед определением D суспензию микроводорослей в пробе тщательно перемешивали. Для измерения сухой массы аликвоту суспензии (10 мл) помещали в пробирки, которые предварительно доводили до постоянной массы в сушильном шкафу при (+105 ± 3) °С в течение суток. С помощью центрифуги лабораторной ОПн-3 с максимальным фактором разделения $g = 1,870$ при 3000 об·мин⁻¹ осаждали клетки на протяжении 15 мин, после чего аккуратно сливали супернатант. Клетки микроводорослей промывали

от солей тем же объёмом дистиллированной воды и ещё раз центрифугировали. На заключительном этапе пробирки с биомассой высушивали в сушильном шкафу при $(+105 \pm 3)$ °С в течение суток. По разнице начальной и конечной массы пробирок определяли сухую массу *S. rubescens* в отфильтрованном объёме, после чего проводили пересчёт на 1 л.

Удельную скорость роста (μ) вычисляли путём аппроксимации кривой роста биомассы в экспоненциальной фазе по формуле:

$$\mu = \frac{\ln B_2 - \ln B_1}{t_2 - t_1}, \quad (3)$$

где $\ln B_1$ и $\ln B_2$ — биомасса в начале и конце экспоненциальной фазы роста;

t_1 и t_2 — время в начале и конце экспоненциальной фазы роста [Тренкеншу, 2019].

Максимальная продуктивность культуры (P) для каждого варианта эксперимента рассчитана путём аппроксимации кривой роста биомассы в линейной фазе по формуле:

$$P = \frac{B_2 - B_1}{t_2 - t_1}, \quad (4)$$

где B_1 и B_2 — биомасса в начале и конце фазы линейного роста [Тренкеншу, 2005].

Урожай культуры для каждого варианта эксперимента (H) определён по формуле:

$$H = B_{max} - B_0, \quad (5)$$

где B_0 — биомасса в начале эксперимента;

B_{max} — максимальная биомасса за время эксперимента [Лелеков, Тренкеншу, 2007].

Состояние клеток микроводоросли *S. rubescens* и чистоту культуры контролировали с помощью светового микроскопа Carl Zeiss Axiostar Plus (Германия) при увеличении 400х.

Содержание пигментов (хлорофилл *a*, хлорофилл *b* и каротиноиды) определяли спектрофотометрическим методом. Пробы отбирали в трёх повторностях после тщательного перемешивания культуры на 2, 4, 6, 10 и 16-е сут эксперимента. Суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 3000 об·мин⁻¹, надосадочную жидкость сливали, осаждённую биомассу замораживали на 24 ч и использовали для определения пигментов. Пигменты экстрагировали из клеток микроводорослей 100%-ным ацетоном (химически чистым, «ЭКОС-1», Россия). Спектры поглощения ацетоновых экстрактов фиксировали на спектрофотометре СФ-2000 («ОКБ Спектр», Россия) в диапазоне 400–800 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Расчёт концентраций хлорофилла *a* и *b* и суммарного содержания каротиноидов проводили по формулам, предложенным [Wellburn, 1994], по значениям оптической плотности (D) на длинах волн, которые соответствуют максимумам поглощения этих пигментов:

$$\begin{aligned} Chl a &= 11,75 \times D_{662} - 2,35 \times D_{645}; \\ Chl b &= 18,61 \times D_{645} - 3,96 \times D_{662}; \\ Carotenoids &= (1000 \times D_{470} - 2,27 \times Chl a - 81,4 \times Chl b)/227. \end{aligned} \quad (6)$$

Определяли средние арифметические (\bar{x}), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних значений и доверительные интервалы для средних ($\Delta\bar{x}$). Расчёты проводили в программах LibreOffice и SciDAVis для уровня значимости $\alpha = 0,05$. В таблицах представлены средние значения и вычисленные доверительные интервалы ($\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$) для трёх повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В течение 16 сут микроводоросли выращивали на трёх типах питательных сред, в трёх лабораторных культиваторах, в условиях круглосуточного освещения. Динамика плотности культур микроводорослей описывается накопительными кривыми (рис. 1).

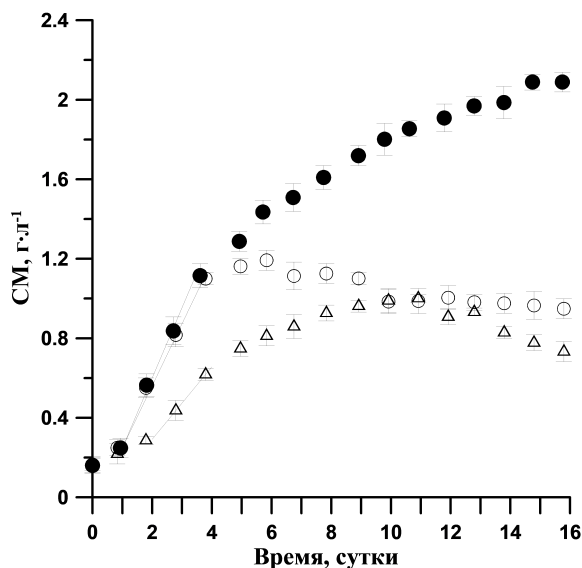


Рис. 1. Динамика плотности накопительной культуры *Scenedesmus rubescens* при выращивании на питательных средах Тамия (●), ВВМ (○) и Тамия $\frac{1}{2}$ (Δ)

Fig. 1. Dynamics of the density of *Scenedesmus rubescens* batch culture when grown on Tamiya nutrient medium (●), ВВМ (○), and Tamiya $\frac{1}{2}$ nutrient medium (Δ)

Удельная скорость роста (μ) для микроводорослей на средах Тамия и ВВМ рассчитана исходя из концентраций биомассы в период экспоненциальной фазы [см. уравнение (3)]. Определены кинетические характеристики *S. rubescens* при выращивании на трёх средах (табл. 2).

Таблица 2. Кинетические характеристики роста микроводоросли *Scenedesmus rubescens*

Table 2. Kinetic characteristics of *Scenedesmus rubescens* growth

Параметр	Среда Тамия	Среда Тамия $\frac{1}{2}$	Среда ВВМ
Урожай, г сухой массы·л ⁻¹	1,94 ± 0,06	0,84 ± 0,02	1,03 ± 0,04
Максимальная продуктивность, г сухой массы·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	0,35 ($R^2 = 0,97$)	0,18 ($R^2 = 0,98$)	0,31 ($R^2 = 0,99$)
Удельная скорость роста, сут ⁻¹	0,48 ($R^2 = 0,99$)	0,31 ($R^2 = 0,99$)	0,49 ($R^2 = 0,99$)

Линейный рост *S. rubescens* для всех вариантов эксперимента наблюдали с 1-х по 4-е сут. Значения биомассы за этот период использовали для расчёта скорости роста водорослей. После 6 дней рост культуры на питательной среде ВВМ прекратился, началась фаза отмирания микроводорослей. К этому моменту прирост биомассы составил 1,03 г·л⁻¹. Следует отметить, что в линейной фазе на среде Тамия $\frac{1}{2}$ скорость роста *S. rubescens* была практически вдвое ниже, чем таковая для других вариантов. На 10-е сут опыта плотность культур в вариантах № 2 и 3 сравнялась. Далее зарегистрирована фаза отмирания микроводорослей на среде Тамия $\frac{1}{2}$.

Биохимический анализ биомассы микроводорослей, выращенных на полной питательной среде Тамия, показал: содержание хлорофилла *a* в клетках в процессе культивирования увеличилось с 2,34 % в начале линейной фазы роста до 2,62 % (рис. 2). Затем концентрация пигмента постепенно снижалась; минимального значения, 1,77 %, она достигла на 16-е сут эксперимента.

Аналогичную динамику хлорофилла *a* наблюдали в клетках микроводорослей при использовании питательной среды Тамия 1/2, однако концентрация пигмента была вдвое ниже. При выращивании *S. rubescens* на среде BBM содержание хлорофилла *a* увеличилось с 2,25 до 2,63 %. На заключительной стадии эксперимента, при достижении стационарной фазы роста и фазы отмирания микроводорослей, значения концентрации хлорофилла *a* для трёх вариантов при расчёте на 1 л культуры вышли практически на один уровень.

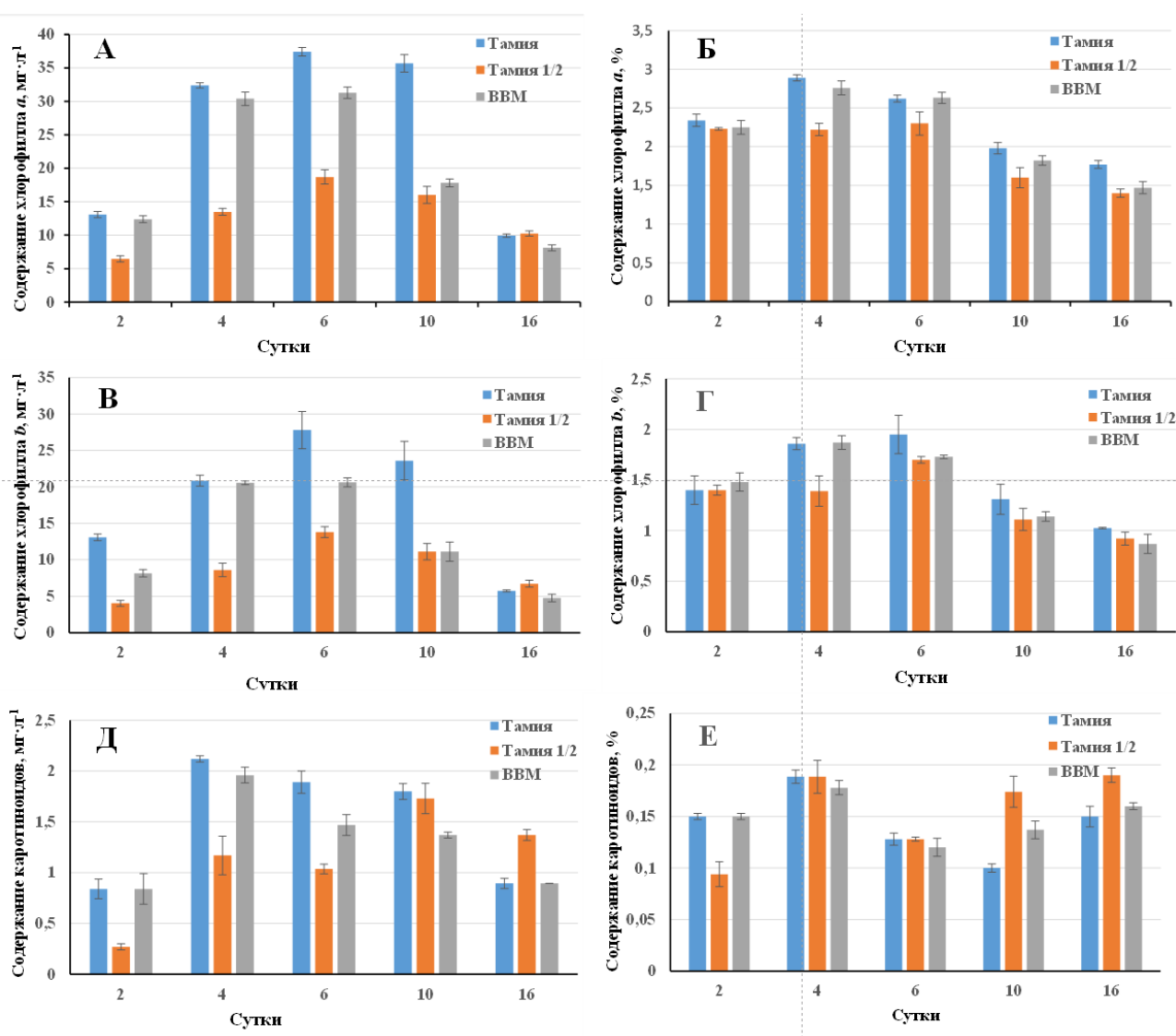


Рис. 2. Динамика содержания пигментов: А, В, Д — в культуре *Scenedesmus rubescens* при выращивании на питательных средах Тамия, Тамия 1/2 и BBM, мг·л⁻¹; Б, Г, Е — в сухой биомассе микроводорослей, %

Fig. 2. Dynamics of pigment accumulation: А, В, Д, in *Scenedesmus rubescens* culture when grown on Tamiya nutrient medium, Tamiya 1/2 nutrient medium, and BBM, mg·L⁻¹; Б, Г, Е, in the dry biomass of the microalga, %

ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор сред Тамия, Тамия $\frac{1}{2}$ и ВВМ обусловлен разницей в составе и широким диапазоном концентрации питательных веществ, используемых для их приготовления. Так, среда Тамия является одной из самых концентрированных минеральных сред, применяемых для получения интенсивных, плотных культур зелёных микроводорослей. Напротив, для приготовления среды ВВМ используются невысокие концентрации минеральных веществ. В качестве промежуточного варианта по значениям концентрации мы применяли среду Тамия с половинным составом нутриентов.

Экспоненциальный рост *S. rubescens* на средах Тамия и ВВМ наблюдали в 1-е сут эксперимента, на среде Тамия $\frac{1}{2}$ — в течение первых 2 сут. Известно, что в этот период удельная скорость роста постоянна и имеет максимальные значения [Лелеков, Тренкеншу, 2007]. Рост *S. rubescens* на питательных средах ВВМ и Тамия характеризовался высокой удельной скоростью, 0,48 и 0,49 сут⁻¹, а рост на среде Тамия $\frac{1}{2}$ — значением 0,33 сут⁻¹. В работе [Nur et al., 2014] удельная скорость роста *Scenedesmus* на среде ВВМ составила $(0,22 \pm 0,04)$ сут⁻¹, что в 2,2 раза ниже значений, полученных нами.

Выше упомянуто, что линейный рост *S. rubescens* для всех вариантов опыта наблюдали по 4-е сут. Следует отметить существенное превышение скорости роста микроводорослей на питательных средах Тамия и ВВМ по сравнению с таковым на среде Тамия $\frac{1}{2}$. За 4 сут эксперимента биомасса микроводорослей в вариантах № 1 и 3 увеличилась практически в 7 раз, а в варианте № 2 — в 3,7 раза. Максимальная продуктивность *S. rubescens* для вариантов опыта № 1, 2 и 3 составляла при этом 0,35, 0,18 и 0,31 г сухой массы·л⁻¹·сут⁻¹ соответственно. Важно, что на данном этапе никакие изменения морфологии клеток ни в одном из вариантов эксперимента не зафиксированы. С 5-х по 9-е сут отмечен линейный рост культуры с меньшим углом наклона накопительной кривой для сред Тамия и Тамия $\frac{1}{2}$. Возможно, это связано со сменой лимитирующего рост фактора.

Известно, что на линейном участке скорость роста микроводорослей определяется величиной светового потока или концентрацией углекислого газа, которые полностью поглощаются культурой, что приводит к снижению продуктивности. Учитывая, что в нашем эксперименте культура непрерывно барботировалась газовоздушной смесью с CO₂, можно предположить, что его содержание в среде было достаточным для поддержания оптимального уровня фотосинтеза и роста микроводорослей. Таким образом, лимитирование роста *S. rubescens* по углероду в данный период можно исключить. Вероятно, в вариантах № 2 и 3 интенсивный рост микроводорослей был ограничен недостатком биогенных элементов.

За весь период выращивания *S. rubescens* на питательной среде ВВМ наибольшая плотность культуры составила 1,2 г·л⁻¹, что превышает максимальное значение плотности *Scenedesmus* sp., полученное в работе [Muluye et al., 2021], — 0,75 г·л⁻¹ за 7 дней выращивания на среде ВВМ без дополнительной подачи CO₂. Также авторами определена максимальная продуктивность *Scenedesmus* sp. — 107 мг·л⁻¹·сут⁻¹; это в 3 раза ниже значения, полученного в настоящем исследовании. Такую разницу кинетических характеристик роста микроводорослей можно объяснить дополнительной подачей в наших экспериментах углекислого газа в культуру, причём pH среды во всех вариантах опыта не увеличивался и находился в диапазоне 6,5–7.

Кислотность культуральной среды очень важна: уровень pH определяет доступность CO₂ и питательных веществ для микроводорослей, а также оказывает существенное влияние на их метаболизм. При высоких значениях pH образуются карбонаты, что ограничивает доступность углекислого газа; как следствие, мы наблюдаем снижение эффективности фотосинтеза и подавление роста клеток микроводорослей. Как известно, оптимальный уровень pH для каждого вида варьирует в узком диапазоне и зачастую зависит от вида водорослей

и конкретного штамма [Drira et al., 2017]. Это связано с физиологическими особенностями микроводорослей, определяющими их способность адаптироваться к различным условиям внешней среды. Для большинства пресноводных водорослей, в том числе для *Chlorella vulgaris* Beijerinck, 1890 и *S. rubescens*, оптимальный уровень pH обычно составляет 7–8. Высокие концентрации CO₂ (> 5 %) могут негативно влиять на скорости поглощения микроводорослями субстрата и света и, как следствие, на скорость роста и на морфологию клеток. Например, в работах [Jena et al., 2012; Zhang et al., 2022] показано, что повышенный уровень углекислого газа способствовал образованию более крупных колоний *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing, 1833. Таким образом, поддержание необходимого значения pH в процессе культивирования микроводорослей и возможность управления его уровнем критически важны: отклонение pH от оптимального может привести к замедлению роста или даже к гибели клеток. Поскольку культуры *S. rubescens* дополнительно снабжались CO₂, а pH среды поддерживался на оптимальном уровне, можно утверждать: эти факторы не влияли на результаты исследования; различия между вариантами эксперимента обусловлены только составом питательных сред.

На начальном этапе опыта во всех его вариантах большинство клеток микроводорослей были ярко-зелёного цвета и имели неповреждённый хлоропласт. Далее мы наблюдали морфологические изменения клеток *S. rubescens*, что связано, по-видимому, с составом сред, на которых выращивали микроводоросли. Начиная со второй недели культивирования на среде ВВМ появлялись единичные клетки с повреждёнными хлоропластами. С 6–7-х сут на среде Тамия ½ до 10 % клеток имели частично фрагментированный хлоропласт. С 10-го дня выращивания на средах Тамия ½ и ВВМ культуры становились желтовато-зелёными, что было вызвано, вероятно, частичной деградацией пигментного комплекса.

Начиная с 5-х сут эксперимента содержание каротиноидов в клетках *S. rubescens* при культивировании на питательных средах Тамия и ВВМ возрастало пропорционально увеличению биомассы, а затем постепенно снижалось. Отмеченная закономерность накопления каротиноидов в цикле культивирования микроводорослей хорошо согласуется с результатами, представленными в работе [Божков, Мензянова, 1997]. При выращивании *S. rubescens* на питательной среде Тамия ½ с переходом культуры в стационарную фазу роста мы наблюдали резкое возрастание концентрации каротиноидов (см. рис. 2). Известно, что повышенное их количество в микроводорослях обычно связано с различными стрессовыми условиями. Например, когда микроводоросли сталкиваются с дефицитом основных питательных элементов (азот, фосфор, калий или магний), они могут синтезировать больше каротиноидов для защиты клеток [Hu et al., 2013].

Отметим, что в вариантах № 1 и 3 в конце линейной фазы роста микроводоросли имели равные показатели концентрации биомассы, при этом и относительное содержание хлорофилла *a* и *b* характеризовалось практически одинаковыми значениями. Принимая во внимание тот факт, что стоимость полной питательной среды Тамия на порядок выше стоимости среды ВВМ, можно сделать вывод об экономической целесообразности использования среды ВВМ, но при условии организации сбора урожая на 4–5-е сут накопительного выращивания либо при обеспечении квазинепрерывного процесса культивирования.

При выращивании *S. rubescens* на питательной среде Тамия ½ в заключительных фазах роста в полученной биомассе зафиксированы бóльшие концентрации каротиноидов, чем для двух других вариантов эксперимента, однако эта среда не может быть рекомендована для интенсивного выращивания *S. rubescens* с целью получения биохимически ценных веществ. Установлено, что затраты на приготовление питательной среды Тамия ½ в 5 раз превышали затраты на приготовление среды ВВМ, а скорость роста микроводорослей при этом была в 2 раза ниже.

Проанализировав динамику относительного содержания каротиноидов в клетках *S. rubescens*, выращенных на трёх питательных средах, мы выявили, что их конечная концентрация при культивировании на среде Тамия $\frac{1}{2}$ выше на 35 %, чем для вариантов № 1 и 3. С учётом того, что среда Тамия $\frac{1}{2}$ является менее сбалансированной и подходящей для интенсивного культивирования данного вида, накопление каротиноидов — это, вероятно, защитная реакция *S. rubescens* на неблагоприятные условия роста. Данный факт ещё раз подчёркивает оптимальность выбора питательной среды Тамия или ВВМ для интенсивного культивирования этого вида.

Полученные в эксперименте результаты свидетельствуют об очень близких ростовых характеристиках культуры *S. rubescens* в вариантах № 1 и 3 в диапазоне экспоненциальной и линейной фаз роста, что позволяет подобрать условия, которые могут обеспечить на среде ВВМ высокую продуктивность и накопление фотосинтетических пигментов, аналогичные таковым для варианта на среде Тамия.

На основе проведённых исследований и расчётов можно заключить, что использование питательной среды ВВМ является экономически оправданным при условии, что сбор полного урожая осуществляется на 4–5-е сут накопительного выращивания либо применяется режим квазинепрерывного культивирования. Для подтверждения сделанных выводов требуется апробация выращивания *S. rubescens* на среде ВВМ в квазинепрерывном режиме с плотностью культуры микроводорослей в диапазоне $0,4\text{--}1,2\text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$.

Выводы. В ходе проведённого исследования проанализированы параметры роста и содержание фотосинтетических пигментов в культуре *Scenedesmus rubescens*, выращенной на трёх типах минеральных питательных сред — на полной среде Тамия, её половинной модификации (Тамия $\frac{1}{2}$) и среде Болда (Bold's basal medium, ВВМ). Установлены значимые отличия биохимических и кинетических характеристик роста *S. rubescens*. Выявленная максимальная продуктивность для вариантов эксперимента № 1, 2 и 3 составляла $0,35$, $0,18$ и $0,31\text{ г сухой массы}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ соответственно. Наибольшие концентрации хлорофилла *a* и *b* зафиксированы при выращивании микроводорослей на питательных средах Тамия и ВВМ. Полученные в опыте результаты свидетельствуют об очень близких ростовых характеристиках культуры *S. rubescens* в вариантах № 1 и 3 в диапазоне экспоненциальной и линейной фаз роста. Это позволяет рассматривать среду ВВМ как альтернативу более дорогостоящей среде Тамия для накопительного культивирования *S. rubescens*. Среда Тамия $\frac{1}{2}$ из исследованных типов питательных сред была признана третьей по эффективности с точки зрения роста микроводорослей.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Божков А. И., Мензянова Н. Г. Динамика роста, липидный состав и содержание β -каротина в клетках *Dunaliella viridis* Teod. при культивировании в разных типах фотобиореакторов // *Альгология*. 1997. Т. 7, № 1. С. 78–86. [Bozhkov A. I., Menzyanova N. G. The growth dynamics, lipid composition and β -carotene content in *Dunaliella viridis* Teod. cells at cultivation in different types of photobioreactors. *Al'gologiya*, 1997, vol. 7, no. 1, pp. 78–86. (in Russ.)]
2. Горбунова С. Ю., Зубко В. А. Использование *Scenedesmus bijugatus* (Lageth.) для биологической доочистки сточных вод // *Современные проблемы экологии Азово-Черноморского региона* : материалы V Международной конференции, 8–9 октября 2009 г., Керчь, ЮгНИРО. Керчь : Изд-во ЮгНИРО, 2010. С. 105–110. [Gorbunova S. Yu., Zubko V. A. Use of *Scenedesmus bijugatus* (Lageth.) for abatement of waste waters pollution. In: *Current Problems*

- of the Azov–Black Sea Region Ecology : materials of the V International Conference, 8–9 October, 2009, Kerch, YugNIRO. Kerch : YugNIRO Publishers, 2010, pp. 105–110. (in Russ.)]*
3. Горбунова С. Ю., Гудвилевич И. Н. Выращивание *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler на сточных водах птицефабрик // *Теоретическая и прикладная экология*. 2020. № 4. С. 68–74. [Gorbunova S. Yu., Gudvilovich I. N. Cultivation of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler on waste water of poultry farms. *Teoreticheskaya i prikladnaya ekologiya*, 2020, no. 4, pp. 68–74. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.25750/1995-4301-2020-4-068-074>
 4. Лелеков А. С., Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. 4. Экспоненциальная и линейная фазы роста // *Экология моря*. 2007. Вып. 74. С. 47–49. [Lelekov A. S., Trenkenshu R. P. Simplest models of microalgae growth. 4. Exponential and linear growth phases of microalgae culture. *Ekologiya morya*, 2007, iss. 74, pp. 47–49. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4780>
 5. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура // *Экология моря*. 2005. Вып. 67. С. 89–97. [Trenkenshu R. P. Simplest models of microalgae growth. 1. Batch culture. *Ekologiya morya*, 2005, iss. 67, pp. 89–97. (in Russ.)]. <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4658>
 6. Тренкеншу Р. П. Расчёт удельной скорости роста микроводорослей // *Морской биологический журнал*. 2019. Т. 4, № 1. С. 100–108. [Trenkenshu R. P. Calculation of the specific growth rate of microalgae. *Marine Biological Journal*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 100–108. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.1.09>
 7. Тренкеншу Р. П., Лелеков А. С., Боровков А. Б., Новикова Т. М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей // *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 1 (13). [Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Borovkov A. B., Novikova T. M. Unified installation for microalgae laboratory studies. *Voprosy sovremennoi algologii*, 2017, no. 1 (13). (in Russ.)]. URL: <http://algology.ru/1097> [accessed: 23.11.2024].
 8. Руденко Р. А., Ткачева И. В. Биотехнология водорослей в аквакультуре // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2021. № 8 (110), ч. 1. С. 136–138. [Rudenko R. A., Tkacheva I. V. Algae biotechnology in aquaculture. *Mezhdunarodnyi nauchno-issledovatel'skii zhurnal*, 2021, no. 8 (110), pt 1, pp. 136–138. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.23670/irj.2021.110.8.021>
 9. Bischoff H. W., Bold H. C. *Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species*. Austin, TX : University of Texas, 1963, vol. 6318, 95 p. (Phycological Studies. IV).
 10. Chu W. L. Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine and Education*, 2012, iss. 6, suppl. 1, pp. s24–s37. <https://doi.org/10.56026/imu.6.suppl1.s24>
 11. Drira N., Dhoubi N., Hammami S., Piras A., Rosa A., Porcedda S., Dhaouadi H. Fatty acids from high rate algal pond's microalgal biomass and osmotic stress effects. *Bioresource Technology*, 2017, vol. 244, pt 1, pp. 860–864. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.052>
 12. Fan M., Liao Z., Wang R., Xu N. Isolation and antibacterial activity of *Anabaena* phycocyanin. *African Journal of Biotechnology*, 2013, vol. 12, no. 15, pp. 1869–1873. <https://doi.org/10.5897/ajb12.2575>
 13. Fasaie F., Bitter J. H., Slegers P. M., van Bontel A. J. B. Techno-economic evaluation of microalgae harvesting and dewatering systems. *Algal Research*, 2018, vol. 31, pp. 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.038>
 14. Guedes A. C., Gião M. S., Matias A. A., Nunes A. V. M., Pintado M. E., Duarte C. M. M., Malcata F. X. Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls *a*, *b* and *c*, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing. *Journal of Food Engineering*, 2013, vol. 116, iss. 2, pp. 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.015>
 15. Hase E., Morimura Y., Tamiya H. Some data on the growth physiology of *Chlorella* studied by the technique of synchronous culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1957, vol. 69, pp. 149–165. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90482-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90482-4)
 16. Hu Q. Environmental effects on cell composition. In: *Handbook of Microbial Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. 2nd edition / A. Richmond,

- Q. Hu (Eds). Chichester : Wiley Blackwell, 2013, pp. 114–122.
17. Ishaq A., Peralta H. M. M., Basri H. Bioactive compounds from green microalga *Scenedesmus* and its potential applications: A brief review. *Journal of Tropical Agricultural Science*, 2016, vol. 39, iss. 1, pp. 1–16.
 18. Jena J., Nayak M., Panda H. S., Pradhan N., Sarika C., Panda P. K., Rao B. V. S. K., Prasad R. B. N., Sukla L. B. Microalgae of Odisha coast as a potential source for biodiesel production. *World Environment*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 11–16. <https://doi.org/10.5923/j.env.20120201.03>
 19. Jo S.-W., Hong J. W., Do J. -M., Na H., Kim J.-J., Park S.-I., Kim Y.-S., Kim I.-S., Yoon H.-S. Nitrogen deficiency-dependent abiotic stress enhances carotenoid production in indigenous green microalga *Scenedesmus rubescens* KNUA042, for use as a potential resource of high value products. *Sustainability*, 2020, vol. 12, iss. 13, art. 5445 (25 p.). <https://doi.org/10.3390/su12135445>
 20. Levasseur W., Perré P., Pozzobon V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 2020, vol. 41, art. 107545 (21 p.). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
 21. Mayeli S. M., Nandini S., Sarma S. S. S. The efficacy of *Scenedesmus* morphology as a defense mechanism against grazing by selected species of rotifers and cladocerans. *Aquatic Ecology*, 2004, vol. 38, iss. 4, pp. 515–524. <https://doi.org/10.1007/s10452-005-0329-9>
 22. Muluye A., Sali B., Bahta B., Melese B., Girma B., Kebede M., Kebede M., Suresh A. Potential of human urine as a nutrient medium for the biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. *East African Journal of Agriculture and Biotechnology*, 2021, vol. 3, no. 1, pp. 35–41. <https://doi.org/10.37284/ejab.3.1.409>
 23. Patil L., Kaliwal B. B. Microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with *in vitro* pharmacological applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2019, vol. 42, iss. 6, pp. 979–994. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02099-5>
 24. Nur Z., Mohd S., Hasnun N. I., Chia C. T., Mutalib A. The growth performance of freshwater *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. in different media. *Journal of Applied Science and Agriculture*, 2014, vol. 9, spec. iss. 11, pp. 119–125.
 25. Rahman M., Hosano N., Hosano H. Recovering microalgal bioresources: A review of cell disruption methods and extraction technologies. *Molecules*, 2022, vol. 27, iss. 9, art. 2786 (31 p.). <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>
 26. Sandmann M., Münzberg M., Bressel L., Reich O., Hass R. Inline monitoring of high cell density cultivation of *Scenedesmus rubescens* in a mesh ultra-thin layer photobioreactor by photon density wave spectroscopy. *BMC Research Notes*, 2022, vol. 15, iss. 1, art. 54 (7 p.). <https://doi.org/10.1186/s13104-022-05943-2>
 27. Suresh A., Benor S. Microalgae-based biomass production for control of air pollutants. In: *From Biofiltration to Promising Options in Gaseous Fluxes Biotreatment. Recent Developments, New Trends, Advances, and Opportunities* / G. Soreanu, É. Dumon (Eds). Amsterdam, Netherlands ; Oxford, UK ; Cambridge, MA, US : Elsevier, 2020, pp. 345–372. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819064-7.00017-0>
 28. Tamiya H. Mass culture of algae. *Annual Review of Plant Biology*, 1957, vol. 8, pp. 309–334. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.08.060157.001521>
 29. Wellburn A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 1994, vol. 144, iss. 3, pp. 307–313. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)81192-2)
 30. Zhang X., Wei X., Hu X., Yang Y., Chen X., Tian J., Pan T., Ding B. Effects of different concentrations of CO₂ on *Scenedesmus obliquus* to overcome sludge extract toxicity and accumulate biomass. *Chemosphere*, 2022, vol. 305, art. 135514 (10 p.). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135514>

**ESTIMATION OF THE PRODUCTION CHARACTERISTICS
AND CHEMICAL COMPOSITION OF *SCENEDESMUS RUBESCENS*
WITH VARYING AVAILABILITY OF MINERAL SUBSTRATE**

S. Gorbunova, A. Borovkov, and R. Trenkenshu

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation
E-mail: svetlana_8423@mail.ru

Biotechnology of microalgae is a promising field for obtaining renewable sources of biomass rich in proteins, lipids, and pigments; this makes the search for optimal cultivation conditions highly relevant. Representatives of the genus *Scenedesmus* Meyen, 1829 feature rapid growth, resistance to environmental changes, and high content of biologically active compounds, which determines their potential for use in the food, pharmaceutical, and energy industries. The aim of the study was to analyze the growth performance and photosynthetic pigment content in a culture of *Scenedesmus rubescens* (P. J. L. Dangeard) E. Kessler, M. Schafer, C. Hummer, A. Kloboucek & V. A. R. Huss, 1997 on three types of mineral nutrient media: complete Tamiya medium, its half-strength modification (Tamiya 1/2), and Bold's basal medium (BBM) (variants No. 1, 2, and 3, respectively). In the experiment, *S. rubescens* was cultured for 16 days under continuous illumination and additional carbon dioxide supply. On BBM and Tamiya medium, a high specific growth rate (μ) was recorded: 0.48 and 0.49 day⁻¹, respectively. When using Tamiya 1/2 nutrient medium, *S. rubescens* specific growth rate was lower: 0.33 day⁻¹. Linear growth on all three media was observed up to the 4th day. During this period, the cell density of *S. rubescens* in experimental variants No. 1 and 3 increased nearly 7-fold, and in variant No. 2, by 3.7 times. The maximum productivity of *S. rubescens* for the experimental variants No. 1, 2, and 3 was 0.35, 0.18, and 0.31 g dry weight·L⁻¹·day⁻¹, respectively, with no morphological changes in cells. Significant differences were revealed in the biochemical and kinetic growth characteristics of *S. rubescens* cultured on the three nutrient media. High concentrations of chlorophyll *a* and *b* were recorded in cells grown on Tamiya medium and BBM. The obtained results indicate very similar growth characteristics of *S. rubescens* for variants No. 1 and 3 during the exponential and linear growth phases. This suggests that cultivation on BBM can provide productivity and accumulation of valuable compounds comparable to those reached on Tamiya medium.

Keywords: *Scenedesmus rubescens*, Bold's basal medium, Tamiya nutrient medium, batch culture, productivity, photosynthetic pigments