

EDN HVONNX

DOI 10.5281/zenodo.14184442

УДК 574.55 [57.084.1: 579.23]

Жондарева Я. Д.¹, Рылькова О. А.¹, Дорошенко Ю. В.¹, Николайчук Н. А.²,
Лелеков А. С.¹

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА КУЛЬТУРЫ
CHLORELLA VULGARIS И АССОЦИИРОВАННОЙ С НЕЙ МИКРОБИОТЫ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ПИТАНИЯ**

¹ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени
А.О. Ковалевского РАН»»;

²ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

Реферат. Благодаря уникальному биохимическому составу зеленая микроводоросль *Chlorella vulgaris* используется в сельском хозяйстве и аквакультуре. Это фотосинтезирующий организм, обладающий способностью переключаться в определенных условиях с автотрофного способа питания на ассимиляцию органических соединений, осуществляя миксотрофный тип питания. Использование органических источников углерода и энергии позволяет повысить плотность культуры и ее продуктивность. Цель – изучение влияния фотоавтотрофного и миксотрофного питания на продукционные характеристики роста культуры *Ch. vulgaris*, а также на развитие сопутствующей микробиоты. Исследования проводили в 2024 г. на базе отдела Биотехнологии и фиторесурсов ФИЦ ИнБЮМ (г. Севастополь). При миксотрофном выращивании в качестве органического источника питания использовали глицерин. Для изучения численности и морфологии микроводорослей, а также сопутствующей им микробиоты, использовали методы проточной цитометрии, световой и сканирующей электронной микроскопии. Показано, что при переходе от фотоавтотрофного к миксотрофному питанию средняя продуктивность хлореллы возрастала в шесть раз, продукция хлорофилла *a* – в три раза. Оказалось, что глицерин использовался преимущественно как источник углерода, а не энергии – скорость роста биомассы или концентрации клеток увеличивалась быстрее, чем скорость продукции хлорофилла *a*. КПД фотобиосинтеза для культуры *Ch. vulgaris*, выращенной фотоавтотрофно, составил 5,5 %, а для миксотрофного типа питания – 9,2 %, с учётом энергии света. Концентрация клеток хлореллы при переходе от фотоавтотрофного к миксотрофному типу питания возрастала с 17,35 до 211,65 млн кл.·мл⁻¹, скорость роста возросла в 11 раз. Суммарная численность микробиоты, сопутствующей культуре хлореллы, на фототрофном участке роста микроводорослей составляла 12,05–95,55 млн кл.·мл⁻¹, после добавления глицерина она возрастала до 159,12–319,26 млн кл.·мл⁻¹, а скорость роста ассоциированных бактерий увеличилась более чем в 13 раз. В бактериальном ассоциате обнаружены две группы клеток с различным содержанием ДНК. Максимальные величины бактерий с высоким содержанием ДНК (88 %) обнаружены в стационарной фазе миксотрофного роста. Глицерин и метаболиты микроводорослей способствовали активному развитию микробиоты. Оценка соотношения биомассы *Ch. vulgaris* и бактериальной микробиоты в стационарных фазах роста показала, что доля ассоциированных бактерий составляла 0,07–0,27 % и не оказывала влияния на продукционные характеристики роста культуры *Ch. vulgaris*.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, продуктивность, КПД фотобиосинтеза, миксотрофный тип питания, глицерин, бактериальный ассоциат.

Для цитирования: Жондарева Я. Д., Рылькова О. А., Дорошенко Ю. В., Николайчук Н. А., Лелеков А. С. Продукционные характеристики роста культуры *Chlorella vulgaris* и ассоциированной с ней микробиоты при различных типах питания // Таврический вестник аграрной науки. 2024. № 4(40). С. 83–98. EDN: HVONNX. DOI: 10.5281/zenodo.14184442.

For citation: Zhondareva Ya. D., Rylkova O. A., Doroshenko Yu. V., Nikolaychuk N. A., Lelekov A. S. Production characteristics of the growth of *Chlorella vulgaris* and associated microbiota under different types of nutrition // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2024. No. 4(40). P. 83–98. EDN: HVONNX. DOI: 10.5281/zenodo.14184442.

Введение

Chlorella vulgaris является одной из быстрорастущих одноклеточных зелёных водорослей, максимальная удельная скорость роста которой достигает $0,37 \text{ ч}^{-1}$ [1]. Благодаря высокой скорости роста культура хлореллы с середины прошлого столетия является модельным объектом при исследованиях фотосинтеза. На сегодняшний день установлены количественные взаимосвязи оптических, продукционных и фотоэнергетических характеристик культуры *Ch. vulgaris* с интенсивностью светового потока и концентрацией минеральных компонентов питательной среды [1]. Фундаментальные исследования показали возможность создания устойчивых систем непрерывного биосинтеза, что позволило использовать хлореллу как фотоавтотрофный компонент замкнутой искусственной экосистемы [2].

С практической точки зрения биомасса *Ch. vulgaris* обладает богатым биохимическим составом. Она способна накапливать до 50–60 % белка, синтезировать восемь незаменимых аминокислот (10–15 % от общего количества белка). Липиды, применяемые для получения биотоплива, в биомассе хлореллы составляют от 15 до 30 %, в том числе ненасыщенные жирные кислоты (α - и γ -линолевая). Можно отметить наличие витаминов (В₆, В₁₂, Е и С), минеральных веществ, таких как калий, натрий, магний, железо, медь, кальций и селен. Кроме того, *Ch. vulgaris* используется в животноводстве, аквакультуре, растениеводстве, а также для производства биополимеров и др. [3, 4].

Она может способствовать накоплению органических и минеральных форм азота в почве, что стимулирует жизнедеятельность многих почвенных микроорганизмов и сельскохозяйственных культур [5]. В животноводстве и рыбоводстве её применяют для повышения продуктивности и жизнеспособности организмов [6].

У всех живых организмов выделяют два типа питания: автотрофное и гетеротрофное. При фотоавтотрофном питании водоросли сами синтезируют органические вещества из углекислоты и воды за счёт фотосинтеза, а минеральные вещества, необходимые для построения структурных компонентов клеток, поглощаются из внешней среды. Некоторые водоросли способны к гетеротрофному (хемоорганотрофному) питанию [7], то есть они могут использовать для роста в качестве источника, как энергии, так и углерода различные органические вещества. Кроме того, в зависимости от вида и внешних условий у водорослей отмечают миксотрофное питание, при этом источники энергии и минеральных веществ могут быть комбинированными [8]. Известно, что переход от фотоавтотрофного к миксотрофному или гетеротрофному типам питания требует некоторого времени для формирования в клетках ферментных и/или транспортных систем [9]. Использование органических источников углерода и энергии позволяет повысить продуктивность культуры *Ch. vulgaris*, а также значительно увеличить максимальный выход биомассы [10]. В качестве органических источников питания применяют глицерин, глюкозу или ацетат. Для условий промышленного

производства существует практика замены данных веществ на сточные воды, одновременно используя микроводоросли для биоремедиации [11–13].

При выращивании хлореллы в искусственных фотобиореакторах скорость роста культуры обычно лимитирована именно количеством световой энергии, приходящейся на единицу биомассы. Миксотрофный тип выращивания позволяет избежать трудностей, связанных с низкой обеспеченностью световой энергией глубинных слоёв культуры и значительно повысить скорость роста. Помимо скорости роста, ключевой продукционной характеристикой является эффективность использования света или органического субстрата. В настоящее время, несмотря на широкое распространение миксотрофного культивирования хлореллы, в литературе практически не приводятся количественные показатели роста культуры в условиях смены лимитирующих факторов и типов питания.

При миксотрофном способе выращивания микроводорослей особое внимание следует уделять исследованию показателей сопутствующей микробиоты. Скорости роста бактериального ассоциата при внесении в среду органического субстрата могут значительно возрастать и оказывать влияние на развитие культуры микроводорослей.

В естественной среде взаимодействие между микроводорослями и бактериями представляет собой фундаментальную экологическую взаимосвязь, влияющую на круговорот углерода и питательных веществ, а также регулирование продуктивности и стабильности водных пищевых сетей [16]. Для искусственных экосистем описано влияние микробиоты на продукционные характеристики различных низших фототрофов, однако работы немногочисленны [14, 15].

Цель исследований – изучение влияния фотоавтотрофного и миксотрофного типа питания на продукционные характеристики роста интенсивной культуры *Ch. vulgaris*, а также на рост и развитие сопутствующей микробиоты.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили в 2024 г. на базе отдела Биотехнологии и фиторесурсов ФГБУН «ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (г. Севастополь). В исследовании использован штамм *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 из коллекции ФИЦ ИнБЮМ. В зависимости от эксперимента культивирование *Ch. vulgaris* производили в конических колбах объёмом 150 мл и в плоскопараллельных 1 л фотобиореакторах площадью освещаемой поверхности 0,05 м² на среде Тамия [17]. На начальном этапе культура выращивалась в накопительном режиме фотоавтотрофно, средняя освещённость поверхности колбы и фотобиореактора во всех экспериментах составляла 5 клк (16,75 Вт м⁻² или 76 мкмоль·м⁻²·с⁻¹), образцы были выровнены по освещённости. Для миксотрофного и гетеротрофного выращивания в качестве органического источника использовали глицерин (C₃H₈O₃, плотность – 1,26 г мл⁻¹, калорийность – 18 кДж г⁻¹). Глицерин вносили в культуру микроводорослей в стационарной фазе роста. Количество вещества варьировало в зависимости от эксперимента согласно предыдущим расчётам [18]: в колбы добавляли 1 мл на 150 мл культуры, в фотобиореактор – 7 мл на 1 л культуры.

Для равномерного распределения клеток по объёму культура барботировалась воздухом без дополнительного внесения углекислого газа. В качестве источника освещения были использованы горизонтальные световые решётки, состоящие из холодных люминесцентных ламп 18 Вт Philips Daylight TL-D 54-765. Во всех экспериментах были проведены измерения температуры, оптической плотности, pH суспензии, сухого вещества, а также спектрофотометрические и цитометрические исследования образцов культуры.

Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в колбе. Температура на протяжении всего эксперимента составляла 25 °С. Отбор проб для определения оптической плотности проводили после тщательного перемешивания микроводорослей из разных точек внутри колбы. Кювету 1 см располагали максимально близко к фотоприёмнику. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (значение пропускания становится меньше 30 %), проба разбавлялась дистиллированной водой. Для определения сухого вещества (СВ) величина оптической плотности D_{750} , измеренная на фотометре Unicо, была умножена на эмпирический коэффициент $k = 0,45 \text{ г} \cdot \text{СВ} \text{ л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл}^{-1}$. Для определения данного коэффициента была проведена серия параллельных измерений оптической плотности и сухого вещества в граммах при 60 °С. Спектры поглощения были зарегистрированы в 1 см кюветах в диапазоне от 380 до 800 нм на двухлучевом спектрофотометре с интегрирующей сферой Shimadzu UV-2600i (ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ). Согласно методике [19] был рассчитан истинный спектр поглощения, компенсированный на рассеяние. По истинным спектрам поглощения определена концентрация хлорофилла a с помощью разработанного модельного подхода [20].

Полученные значения средних скоростей роста культуры *Ch. vulgaris* были использованы для оценки η (эффективности роста или КПД фотобиосинтеза) при фотоавтотрофном и миксотрофном типах питания. Для вычисления данного параметра использовали формулу:

$$\eta = \frac{P \cdot R}{E},$$

где η – эффективность роста (КПД фотобиосинтеза), %; P – прирост биомассы за сутки или за единицу времени с единицы объёма, г; R – калорийность биомассы *Ch. vulgaris*, Дж г⁻¹; E – поглощённая энергия, Дж.

Цитометрические исследования проводили в неокрашенных пробах в различные периоды роста микроводорослей (при необходимости культуру разбавляли): на линейном участке и в период стационарной фазы фотоавтотрофного роста (5-е и 11-е сутки); после добавления глицерина в активной стадии роста и при максимальной биомассе хлореллы (15-е и 18-е сутки). Бактерии, ассоциированные с культурой хлореллы, окрашивали флуорохромом повышенной яркости SYBR Green I (1000×, «Maclin», Китай). Раствор флуорохрома готовили из расчёта 10 мкл исходного раствора/1 мл стерильной Milli-Q воды и хранили при температуре 20 °С. К 1 мл культуры хлореллы добавляли 10 мкл раствора SYBR Green I и инкубировали в темноте в течение 40 мин непосредственно перед измерениями. Анализ проб выполняли на проточном цитометре MACS Quant Analyzer («Miltenyi Biotec», Германия), оборудованном тремя лазерами (405, 488, 635 нм), в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ.

Численность бактерий определяли с помощью выделения ограниченной зоны популяции клеток (гейтинга) на 2-параметрических цитограммах прямого светорассеивания (FS) и флуоресценции SYBR Green I в зелёной области спектра (канал FL1, 525 нм), численность микроводорослей на цитограммах прямого светорассеивания (FS) и автофлуоресценции хлорофилла (канал FL4, 700 нм) – на безразмерных логарифмических шкалах. Для обработки данных использовали программу FSC Express 7 Research Edition.

При расчете биомассы бактерий использовали коэффициент $2,0 \cdot 10^{-14} \text{ г} \cdot \text{С} \cdot \text{кл}^{-1}$ [21]. Содержание углерода в бактериальных клетках принимали равным 11 %, а долю сухой биомассы – 20 % от сырой биомассы [22].

Для световой микроскопии использовали микроскоп «Микмед-6» («ЛОМО», Россия), при увеличении $\times 1000$, с цифровой камерой «МС-6.3» («ЛОМО», Россия), снабженный компьютерным программным обеспечением MCView («ЛОМО Микросистемы», Россия).

Диаметр клеток определяли по микрофотографиям с помощью программы Image J 1.50i (National Institutes of Health, США, Java 1.6.0_20 (32-bit)).

Результаты и их обсуждение

Продукционные характеристики культуры *Ch. vulgaris* при различном типе питания. На рисунке 1А и 1Б представлены накопительные кривые роста культуры *Ch. vulgaris*. Начальная плотность культуры составила $0,1 \text{ г СВ}\cdot\text{л}^{-1}$. За 11 дней фотоавтотрофного роста плотность культуры достигла $2,3 \text{ г СВ}\cdot\text{л}^{-1}$, биомасса микроводоросли увеличилась более чем в 20 раз. После добавления глицерина на 11-е сутки и непродолжительной адаптации к нему клеток хлореллы продуктивность культуры значительно возросла. На 18-е сутки рост культуры остановился, при этом биомасса хлореллы достигла $6 \text{ г СВ}\cdot\text{л}^{-1}$.

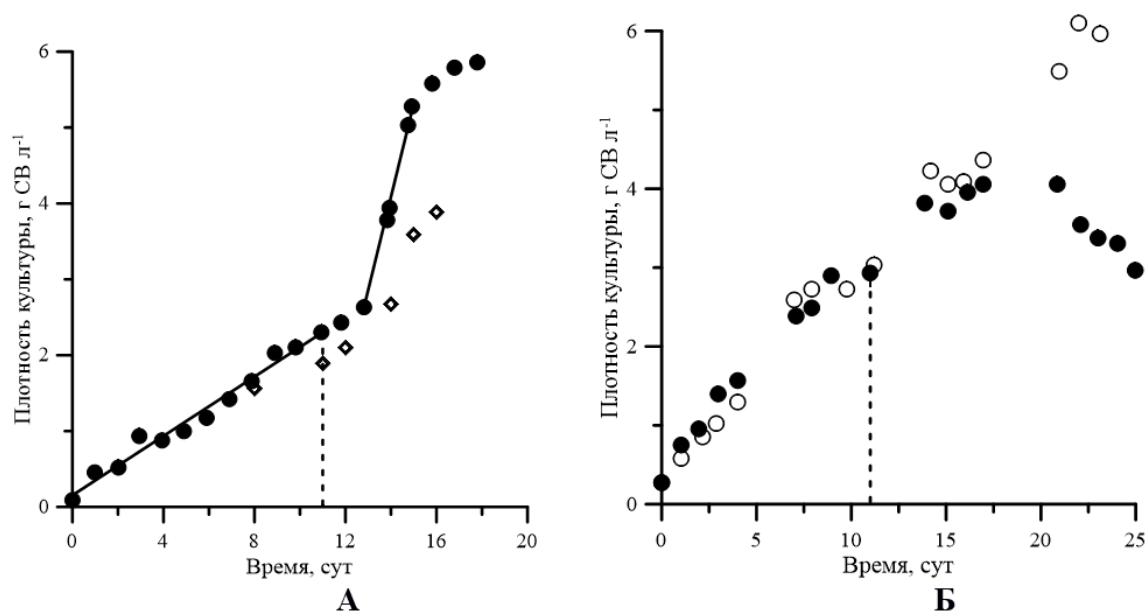


Рисунок 1 – Динамика плотности накопительной культуры *Chlorella vulgaris*

Примечания: А – накопительная кривая роста культуры *Ch. vulgaris* при фотоавтотрофном питании клеток с последующим переходом на миксотрофный тип питания; Б – фотоавтотрофный (○) и гетеротрофный (●) рост культуры *Ch. vulgaris*. Линии – аппроксимация линейных участков кривой. Пунктирная линия обозначает момент добавки глицерина.

Средняя продуктивность *Ch. vulgaris* на фотоавтотрофном и миксотрофном участке кривой составила соответственно $0,19$ и $1,22 \text{ г СВ}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$. Таким образом, добавка органического источника питания позволила увеличить продуктивность микроводоросли более чем в шесть раз. Следует отметить, что в связи с отсутствием в питательной среде Тамия источника углерода, скорость роста на фотоавтотрофном участке кривой была ограничена именно углеродом. Поэтому глицерин использовался хлореллой в качестве источника углерода, а не энергии.

Это подтверждают экспериментальные данные, представленные на рисунке 1Б. Две экспериментальные колбы росли фотоавтотрофно, как и в предыдущем опыте, а в стационарной фазе роста добавили глицерин, после чего одну из колб поместили в темноту, а вторая осталась при той же освещённости.

Очевидно, что без света хлорелла практически не росла, небольшое увеличение биомассы можно объяснить наличием резервов (восстановленных форм АТФ и НАДФН), накопленных за световой период. По исчерпанию резервов биомасса гетеротрофной культуры снижалась за счёт окислительных процессов дыхания, в то время как фотоавтотрофная культура за 25 суток выросла до 6 г сухого вещества на л.

Хлорофилл *a* и его содержание в биомассе можно рассматривать как один из важнейших показателей роста культуры микроводорослей. На рисунке 2А представлена кривая роста по хлорофиллу при фотоавтотрофном и миксотрофном типах питания. Расчёт средней продукции пигмента показал, что при переходе на миксотрофный тип питания скорость биосинтеза хлорофилла *a* увеличивается более чем в три раза – с 2,88 до 9,16 мг·л⁻¹ сут⁻¹. Многочисленные экспериментальные данными для различных видов микроводорослей свидетельствуют о прямой пропорциональной зависимости концентрации хлорофилла *a* от концентрации общего белка [23–27]. Исходя из этого предположения и принимая во внимание, что скорость роста хлореллы увеличилась в шесть, а продукция хлорофилла – в три раза, можно сделать вывод о значительных изменениях биохимического состава биомассы при переходе на миксотрофный тип питания. Рисунок 2 Б демонстрирует снижение содержания хлорофилла *a* в биомассе хлореллы при миксотрофном типе питания. Очевидно, что в таких условиях в биомассе возрастает доля безазотных небелковых соединений. Это явление описано в литературе и для других видов микроводорослей, способных к миксотрофии и рекомендуемых в качестве источника биотоплива [28, 29].

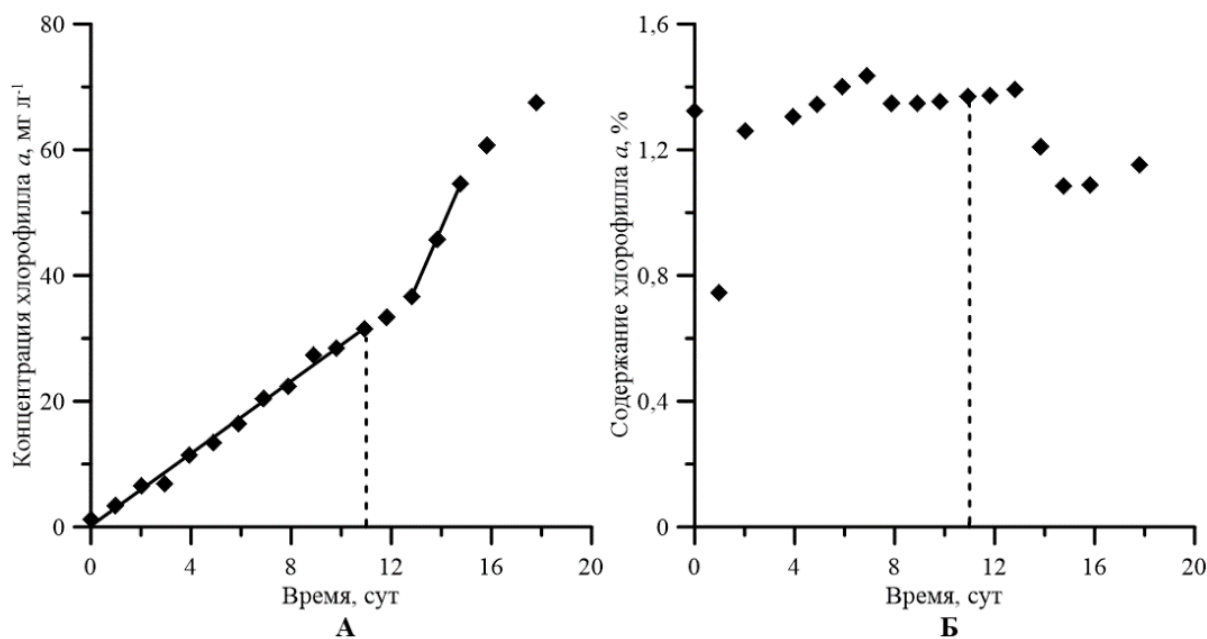


Рисунок 2 – Содержание хлорофилла в накопительной культуре *Ch. vulgaris*

Примечание. А – динамика концентрации хлорофилла *a*; Б – изменение содержания хлорофилла *a*. Линии – аппроксимация линейных участков кривой. Пояснения даны в тексте. Пунктирная линия обозначает момент добавления глицерина.

При оценке КПД фотобиосинтеза η было использовано среднее значение калорийности биомассы микроводорослей R , которое для любых видов составляет около 5 ккал или 20,86 кДж на грамм сухой массы водорослей [1]. Для более точных

расчётов необходимо определять калорийность либо прямым измерением, либо через биохимический состав биомассы (соотношение белков, жиров и углеводов). При наших условиях за сутки на поверхность фотобиореактора поступает: $16,75 \text{ Вт м}^{-2} \cdot 86400 \text{ с} \cdot 0,05 \text{ м}^2 = 72360 \text{ Дж}$ энергии ФАР (E). Будем считать, что вся энергия поглощается культурой, поэтому для фотоавтотрофного участка, с учётом сделанных предположений произведен следующий расчет:

$$\eta_1 = \frac{0,19 \cdot 20860}{72360} \approx 5,5 \text{ \%}.$$

Для миксотрофного участка кривой роста культуры *Ch. vulgaris* поглощённая ей энергия определяется как светом, так и органическим источником энергии (глицерином). Общее количество энергии, поступившее в культуру с глицерином, составляет: $18000 \text{ Дж} \cdot \text{г}^{-1} \times 7 \text{ мл} \times 1,26 \text{ г} \cdot \text{мл}^{-1} = 158760 \text{ Дж}$. Теоретический расчёт максимального количества биомассы, способной образоваться при таком количестве глицерина, показывает, что должно прирасти около 7 г биомассы микроводорослей. Очевидно, что с учетом наличия энергетических потерь на каждом этапе биосинтеза биомассы, реальный прирост будет гораздо меньше. В данном эксперименте прирост биомассы хлореллы на миксотрофном участке составил 3,56 г сухого вещества. Запасённая на миксотрофном участке в биомассе *Ch. vulgaris* энергия составляет: $20860 \text{ Дж г}^{-1} \cdot 3,56 \text{ г} = 74261 \text{ Дж}$. Таким образом, КПД фотобиосинтеза за девять дней роста культуры на миксотрофном участке (η_2):

$$\eta_2 = \frac{3,56 \cdot 20860}{158760 + 9 \cdot 72360} \cdot 100\% \approx 9,2\%$$

Проведённые расчёты показывают, что эффективность роста хлореллы при переходе на миксотрофный тип питания в 1,7 раза выше, чем при фотоавтотрофном. Это, очевидно, объясняется тем, что глицерин как источник C_3 -углерода в органической форме, может поступать напрямую в цикл Кальвина, минуя световую фазу фотосинтеза и первичное присоединение углекислоты к рибулозо-1,5-бисфосфату. Кроме того, клетка, поглощая глицерин, создаёт необходимый пул резервных углеводов, которые являются основой для синтеза всех остальных биохимических составляющих и используются для получения АТФ [30].

Численность клеток культуры *Ch. vulgaris* и сопутствующей микробиоты при различных типах питания.

Исследование миксотрофного типа питания *Ch. vulgaris* неминуемо сопряжено с вопросом о степени влияния бактериальной составляющей на продукционные характеристики роста культуры. Согласно литературным данным, при культивировании хлореллы в лабораторных нестерильных условиях отмечено доминирование видов *Pseudomonas* и *Flavobacterium*, которые являются бактериями-спутниками водорослей [14].

На различных участках накопительной кривой было проведено исследование численности микроводорослей и сопутствующей микробиоты методом проточной цитофлуорометрии. Следует отметить, что при исследовании микроводорослей анализировали группу клеток в области «а», так как область «б» представляла собой клеточные осколки и мёртвые клетки (фотосинтетически неактивная взвесь) (рисунок 3А). При анализе численности гетеротрофных бактерий (после окраски флуорохромом SYBR Green I) были обнаружены две группы клеток с высоким (ВСднк) и низким (НСднк) содержанием ДНК (рисунок 3Б).

В таблице 1 представлено изменение концентрации и скорости роста числа клеток хлореллы.

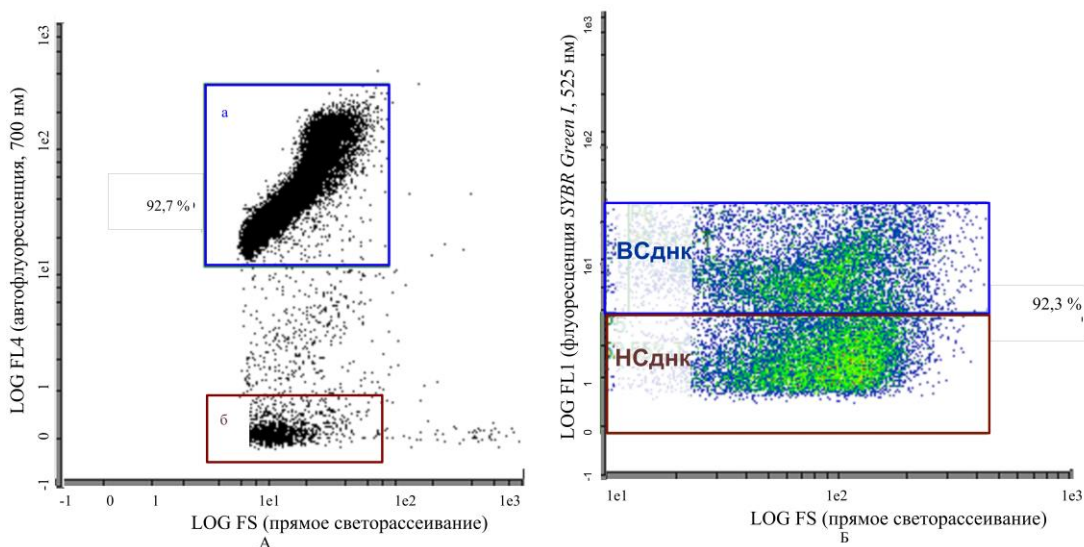


Рисунок 3 – Цитогаммы распределения клеток микроводоросли и бактерий

Примечание. А – культура *Ch. vulgaris* в координатах FS LOG (прямое рассеивание) FL4 LOG (автофлуоресценция); Б – сопутствующая микробиота (после окраски SYBR Green I) в координатах FS LOG (прямое рассеивание) FL1 LOG (зеленая флуоресценция, 525 нм).

Таблица 1 – Изменения количественных и функциональных показателей *Ch. vulgaris* и сопутствующей ей микробиоты на различных этапах эксперимента

Сутки эксперимента	Тип питания, фаза роста	<i>Ch. vulgaris</i>			Ассоциированная микробиота	
		концентрация клеток, млн мл ⁻¹	скорость роста числа клеток, млн мл ⁻¹ сут ⁻¹	диаметр клеток, мкм	численность бактерий, млн кл. мл ⁻¹	интенсивность флуоресценции и_отн. ед.
4	фотоавтотрофный, линейная	17,35	–	5,45 ± 0,32	12,05	<u>20,1</u> 3,2
11	фотоавтотрофный, стационарная	41,37	3,43	5,20 ± 0,37	95,55	<u>41,2</u> 1,38
15	миксотрофный, линейная	94,35	13,25	4,22 ± 1,77	159,12	<u>3,95</u> 1,49
18	миксотрофный, стационарная	211,65	39,1	3,74 ± 0,17	319,26	<u>8,91</u> 2,01

Примечание. В графе «Интенсивность флуоресценции» над чертой указан показатель в клетках с ВСднк, под чертой – с НСднк.

На 4-е сутки фотоавтотрофного культивирования концентрация клеток *Ch. vulgaris* составляла 17,35 млн кл.·мл⁻¹. На 11-е сутки концентрация заметно возросла – 41,37 млн кл.·мл⁻¹, при этом скорость роста числа клеток на фотоавтотрофном участке составила 3,43 млн кл.·мл⁻¹·сут⁻¹. На 15-е сутки после добавления глицерина концентрация клеток хлореллы продолжила увеличиваться и достигла 94,35 млн кл.·мл⁻¹, а на 18-е – 211,65 млн кл.·мл⁻¹. Скорость роста числа клеток также возросла в четыре раза, что свидетельствует об активном размножении водоросли.

Как показано выше, продуктивность хлореллы на фотоавтотрофном участке накопительной кривой составила 0,19 г СВ·л⁻¹·сут⁻¹, а на миксотрофном – 1,22 г СВ·л⁻¹·сут⁻¹. Таким образом, продуктивность увеличилась более чем в шесть раз. В свою очередь, скорость роста числа клеток при переходе от

фотоавтотрофного к миксотрофному типу питания возросла в 11 раз. Это свидетельствует об уменьшении среднего размера микроводорослей, что подтверждено промерами клеток с помощью светового микроскопа. В период фототрофного культивирования на линейной и стационарной стадии роста диаметр клеток составлял $5,45 \pm 0,32$ мкм и $5,20 \pm 0,37$ мкм соответственно. На миксотрофном участке накопительной кривой роста размер клеток снизился до $4,22 \pm 0,29$ мкм в линейной фазе, а на стационарной стадии – до $3,74 \pm 0,17$ мкм (разница с фототрофным ростом достоверна, непарный t-тест, $p < 0,05$) (см. таблицу 1).

При анализе микробиоты, ассоциированной с культурой *Ch. vulgaris*, показано, что суммарная концентрация гетеротрофных микроорганизмов на фототрофном участке при переходе микроводорослей с линейной в стационарную фазу роста возрастала с 12,05 до 95,55 млн кл.·мл⁻¹. После добавления глицерина при переходе к миксотрофному питанию в период линейного роста микроводорослевой культуры *Ch. vulgaris* численность бактерий возрастала в 1,7 раза (до 159,12 млн кл.·мл⁻¹), а к стационарной фазе увеличивалась еще вдвое – до 319,26 млн кл.·мл⁻¹ (см. таблицу 1). Скорость роста ассоциированных бактерий в культуре хлореллы на 11-е сутки составляла 4,69 млн кл.·мл⁻¹·сут⁻¹, на 18-е – достигла 61,88 млн кл.·мл⁻¹, то есть с момента добавления в культуру *Ch. vulgaris* глицерина как источника углерода скорость роста бактерий увеличилась более чем в 13 раз.

Интенсивность флуоресценции ДНК в кластере клеток с ВСднк составляла 3,95–41,2 отн. ед. (максимальные величины обнаружены при фототрофном питании хлореллы), тогда как этот показатель в клетках с НСднк варьировал незначительно и составлял 1,38 – 3,2 отн. ед. (см. таблицу 1). Известно, что клеточный цикл делится на четыре фазы: в фазе G1 происходит синтез РНК и белковых молекул, необходимых для жизнедеятельности клеток, в фазе S – репликация ДНК, фаза G2 нужна для восстановления каких-либо повреждений последовательности ДНК и накопления энергии для последующего митоза, в фазе M, после реорганизации структуры ДНК, происходит деление клетки в процессе митоза [31]. Вероятно, в нашем исследовании клетки с увеличенным содержанием ДНК находились в S-фазе клеточного цикла (репликация ДНК), тогда как бактерии с НСднк – в процессе деления на две дочерние клетки.

Численность бактерий с различным содержанием ДНК менялась на протяжении эксперимента. На фотоавтотрофном участке (4-е сутки) при невысокой численности бактерий вклады различных групп (ВСднк, НСднк) были практически равными и составляли около 57,3 и 42,7 % соответственно. При переходе в стационарную фазу роста микроводорослей (11-е сутки) численность бактерий возрастала, при этом вклад бактерий с ВСднк снижался до 30,8 %, а вклад клеток с НСднк повышался до 69,2 %. Близкое соотношение вкладов обнаружено в период активного линейного роста (15-е сутки) при миксотрофном питании (42,6 и 57,4 %), тогда как на 18-е сутки (стационарная фаза) доля клеток с высоким содержанием ДНК резко возрастала до 88 % (рисунок 4).

Вероятно, добавление глицерина, а также выделенные метаболиты микроводорослей увеличивали пул высокомолекулярных органических веществ в конце эксперимента (в стационарной стадии миксотрофного роста) и способствовали активному развитию микробиоты [32, 33], что выражалось в резком увеличении численности сопутствующей микробиоты, увеличении скорости роста бактерий и доминирующему вкладу клеток с ВСднк (см. таблицу 1, рисунок 4).

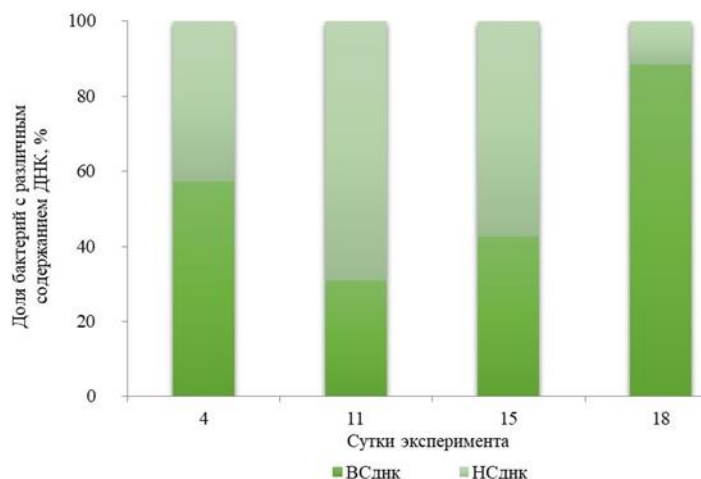


Рисунок 4 – Вклад клеток с высоким (ВСднк) и низким (НСднк) содержанием ДНК в суммарную численность гетеротрофных бактерий на различных этапах эксперимента

Соотношение биомасс культуры *Ch. vulgaris* и сопутствующей микробиоты при различных типах питания.

Биомасса бактерий, рассчитанная по показателям их численности (по данным проточной цитометрии), с учетом известных коэффициентов [21, 22], представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Динамика биомассы бактерий, ассоциированных с культурой *Ch. vulgaris*

Время эксперимента, сутки	Сырая биомасса бактерий, мкг С·мл ⁻¹	Сырая биомасса бактерий, мг·л ⁻¹	Сухая биомасса бактерий, мг·л ⁻¹
4	0,25	2,32	0,46
11	0,91	8,29	1,66
15	5,09	46,27	9,25
18	8,80	80,02	16,00

Показано, что при фотоавтотрофном типе питания в стационарной фазе роста (11 сутки) доля бактерий, ассоциированных с *Ch. vulgaris*, составляла 1,66 мг·л⁻¹ на 2,3 г СВ хлореллы·л⁻¹ или 0,07 %. При добавлении в культуру глицерина вклад бактерий возрастал в четыре раза и составлял 16 мг·л⁻¹ на 6 г СВ хлореллы·л⁻¹ или 0,27 %.

Таким образом, биомасса бактерий была ничтожно мала по сравнению с биомассой хлореллы, и не оказывала существенного влияния на продукционные характеристики роста культуры *Ch. vulgaris*.

Выводы

Исследование роста накопительной культуры зелёной микроводоросли *Ch. vulgaris* показало, что при переходе от фотоавтотрофного к миксотрофному типу питания средняя продуктивность хлореллы возрастала в шесть раз, продукция хлорофилла *a* – в три раза. Глицерин на миксотрофном участке кривой использовался преимущественно как источник углерода, а не энергии, что позволило снять лимитирование роста водоросли углеродом. Добавка глицерина существенно влияет на биохимический состав биомассы *Ch. vulgaris*. Выявлено, что скорость роста биомассы или концентрации клеток увеличивается быстрее, чем скорость

продукции хлорофилла *a*, что приводит к значительным изменениям биохимии водорослей.

КПД фотобиосинтеза для культуры *Ch. vulgaris*, выращенной фотоавтотрофно методом культивирования, составил 5,5 %, а для миксотрофного типа питания – 9,2 % с учётом энергии света.

По данным проточной цитометрии, концентрация клеток хлореллы возросла с 17,35 до 211,65 млн кл.·мл⁻¹. При переходе от фотоавтотрофного к миксотрофному типу питания скорость роста микроводорослей возросла в 11 раз, тогда как размер клеток *Ch. vulgaris* достоверно снижался.

Суммарная концентрации гетеротрофных микроорганизмов на фототрофном участке роста микроводорослей составляла 12,05–95,55 млн кл.·мл⁻¹, после добавления глицерина, при переходе к миксотрофному питанию, она возросла до 159,12–319,26 млн кл.·мл⁻¹. Скорость роста ассоциированных бактерий с момента добавления в культуру *Ch. vulgaris* глицерина в качестве источника углерода увеличилась более чем в 13 раз.

Обнаружены две группы бактериальных клеток с высоким (ВСднк) и низким (НСднк) содержанием ДНК, их доля менялась на протяжении эксперимента. В стационарной фазе миксотрофного роста вклад клеток с высоким содержанием ДНК был максимальным – 88 %. Вероятно, добавление глицерина и выделенные метаболиты микроводорослей способствовали активному развитию микробиоты и приводили к увеличению скорости роста бактерий, а также доминирующему вкладу клеток с ВСднк.

Оценка соотношения биомассы *Ch. vulgaris* и сопутствующей бактериальной микробиоты в стационарных фазах кривой роста при различных типах питания составляла 0,07–0,27 % и не оказывала существенного влияния на продукционные характеристики роста культуры.

Литература

1. Белянин В. Н., Сидько Ф. Я., Тренкеншу А. П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. Новосибирск: Наука, 1980. 136 с.
2. Терсков И. А. Параметрическое управление биосинтезом // Вестник АН СССР. 1976. № 7. С. 61–70.
3. Iyovo G. D., Guocheng D., Chen J. Poultry manure digestate enhancement of *Chlorella vulgaris* biomass under mixotrophic condition for biofuel production // Journal of Microbial & Biochemical Technology. 2010. Vol. 2. No. 2. P. 51–57. DOI: 10.4172/1948-5948.1000023.
4. Tan H. L., Lam M. K., Cheng W. Yo., Lim W. J., Tan I. S., Foo H., Show P. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken waste compost as nutrients source for lipid production // IOP Conf. Ser.: Earth and Environmental Science. “International Conference on Energy and Environmental Science”. 2021. Vol. 721. Art. No. 012011. DOI:10.1088/1755-1315/721/1/012011.
5. Alvarez A. L., Weyers S. L., Goemann H.M., Peyton B. M., Gardner R. D. Microalgae, soil and plants: a critical review of microalgae as renewable resources for agriculture // Algal Research. 2021. Vol. 54. No. 5. P. 102–200. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102200.
6. Сычёва М. В., Торшков А. А., Зобиков А. Е., Немцева Н. В. Физиолого-биохимический статус цыплят-бройлеров при введении в рацион *Chlorella vulgaris* Beijer. IPPASC-2014/1 // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2019. Т. 77. № 3. С. 219–222.
7. Жондарева Я. Д., Тренкеншу Р. П. Характеристики гетеротрофного роста *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin в накопительной культуре // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. 2022. Т. 8. № 3. С. 57–67.
8. Стуколова И. В., Тренкеншу Р. П. Основные типы питания водорослей (краткий глоссарий) // Вопросы современной альгологии. 2020. № 1. С. 34–38. DOI: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-34-38.
9. Тренкеншу Р. П., Жондарева Я. Д. Лаг-период культуры *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin при переходе на гетеротрофный тип питания // Вопросы современной альгологии. 2017. № 1. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://algology.ru/1141> (дата обращения 25.10.2024).
10. Bhatnagar A., Bhatnagar M., Chinnasamy S., Das K. C. *Chlorella minutissima* – a promising

fuel alga for cultivation in municipal wastewaters // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 161. P. 523–536. DOI: 10.1007/s12010-009-8771-0.

11. Saratale R. G., Saratale G. D., Chang J. S., Govindwar S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2011. Vol. 42. P. 138–157. DOI: 10.1016/j.jtice.2010.06.006.

12. Subashchandrabose S. R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation // Environment International. 2013. Vol. 51. P. 59–72. DOI: 10.1016/j.envint.2012.10.007.

13. Mahapatra D. M., Chanakya H. N., Ramachandra T. V. Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater // Bioresource technology. 2014. Vol. 168. P. 142–150. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.130.

14. Борисова Е. В. Видовой состав бактерий, сопутствующий микроводорослям в культуре (Обзор литературы) // Альгология. 1996. Т. 6. № 3. С. 303–313.

15. Игнатенко М. Е., Немцева Н. В. Механизмы взаимодействия автотрофного и гетеротрофного компонентов в альгобактериальных сообществах // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. № 3. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/7IgnatenkoME.pdf> (дата обращения 25.10.2024).

16. Paul C., Pohnert G. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis // PLoS One. 2011. Vol. 1. No. 6. P. 21–32. DOI: 10.1371/journal.pone.0021032.

17. Tamiya H. Mass culture of algae // Annual Review of Plant Physiology. 1957. Vol. 8. P. 309–334. DOI: 10.1146/annurev.pp.08.060157.001521.

18. Жондарева Я. Д., Тренкеншу Р. П., Горбунова С. Ю. Рост *Tetraselmis viridis* Rouch. в накопительной культуре при различном углеродном обеспечении // Ученые записки Крымского федерального университета им. В. И. Вернадского. Биология. Химия. 2022. Т. 8. № 1. С. 95–103.

19. Merzlyak M. N., Naqvi K. R. On recording the true absorption spectrum and the scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Photochem. Photobiol B: Biology. 2000. V. 58. P. 123–129. DOI: 10.1016/s1011-1344(00)00114-7.

20. Чернышев Д. Н., Горбунова С. Ю., Тренкеншу Р. П. Разделение спектров поглощения культуры и ацетонового экстракта микроводоросли *Tetraselmis viridis* на спектры отдельных пигментов // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5. № 2. С. 232–238.

21. Lee S. S., Furman J. A. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton // Applied and Environmental Microbiology. 1987. Vol. 53. No. 6. P. 1298–1303. DOI: 10.1128/aem.53.6.1298-1303.1987.

22. Троицкий А. С., Сорокин Ю. И. К методике расчёта биомассы бактерий в водоёмах // Труды Института биологии внутренних вод. 1967. Вып. 15. С. 85–90.

23. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Тренкеншу Р. П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina platensis* при различных условиях азотного питания // Экология моря. 2002. Вып. 62. С. 61–66.

24. Jallet D., Caballero M. A., Gallina A. A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum* grown in a sinusoidal light regime // Algal Research. 2016. Vol. 18. P. 51–60. DOI: 10.1016/j.algal.2016.05.014.

25. Тренкеншу Р. П., Лелеков А. С., Новикова Т. М. Линейный рост морских микроводорослей в культуре // Морской биологический журнал. 2018. Т. 3. № 1. С. 53–60. DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06.

26. Wu H., Li T., Lv J., Chen Z., Wu J., Wang N., Wu H., Xiang W. Growth and biochemical composition characteristics of *Arthrospira platensis* induced by simultaneous nitrogen deficiency and seawater-supplemented medium in an outdoor raceway pond in winter // Foods. 2021. Vol. 10. Art. No. 2974. DOI: 10.3390/foods10122974.

27. Borovkov A. B., Gudvilovich I. N., Lelekov A. S., Avsiyan A. L. Effect of specific irradiance on productivity and pigment and protein production of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) semi-continuous culture // Bioresource Technology. 2023. Vol. 374. Art. No. 128771. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.128771.

28. Kamyab H., Din M. F., Hosseini S. E., Ghoshal S. K., Ashokkumar V., Keyvanfar A., Shafaghat A., Lee C. T., asghar Bavafa A., Abd Majid M. Z. Optimum lipid production using agro-industrial wastewater treated microalgae as biofuel substrate // Clean Techn Environ Policy. 2016 Vol. 18. No 8. P. 2513-2523. DOI: 10.1007/s10098-016-1212-1.

29. Dario P. P., Balmant W., Lirio F. R., Ramos L.P. Lumped intracellular dynamics: mathematical modeling of the microalgae *Tetrademus obliquus* cultivation under mixotrophic conditions

- with glycerol // Algal Research. 2021. Vol. 57. Art. No. 102344. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102344.
30. Perez-Garcia O, Escalante F. M, de-Bashan L. E, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products // Water Res. 2011. Vol. 45. P. 11–36. DOI: 10.1016/j.watres.2010.08.037.
31. Заварзин А.А., Харазова А.Д., Молитвин М.Н. Биология клетки: общая цитология: учебник. Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургского государственного университета. 1992. 320 с.
32. Сакевич А. И. Экзометаболиты пресноводных водорослей. Киев: Наукова думка, 1985. 199 с.
33. Danger M., Oumarou C., Benest D., Lacroix G. Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton // Functional Ecology. 2007. Vol. 21. P. 202–210. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2006.01222.x
34. Рылькова О. А., Поликарпов И. Г. Сезонная динамика и пространственное распределение структурных показателей бактериопланктонного сообщества бухты Севастопольская (Крым, Чёрное море) // Морской биологический журнал. 2021. Т. 6. № 1. С. 82–101. DOI:10.21072/mbj.2021.06.1.07.

References

1. Belyanin V. N., Sidko F. Ya., Trenkshu A. P. Energy of photosynthetic culture of microalgae. Novosibirsk: Nauka, 1980. 136 p.
2. Terskov I.A. Parametric control of biosynthesis // Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR. 1976. No. 7. P. 61–70.
3. Iyovo G. D., Guocheng D., Chen J. Poultry manure digestate enhancement of *Chlorella vulgaris* biomass under mixotrophic condition for biofuel production // Journal of Microbial & Biochemical Technology. 2010. Vol. 2 (2). P. 51–57. DOI: 10.4172/1948-5948.1000023.
4. Tan H. L., Lam M. K., Cheng W. Y., Lim W. J., Tan I. S., Foo H., Show P. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using chicken waste compost as nutrients source for lipid production // IOP Conf. Ser.: Earth and Environmental Science. “International Conference on Energy and Environmental Science”. 2021. Vol. 721. Art. No. 012011. DOI: 10.1088/1755-1315/721/1/012011.
5. Alvarez A. L., Weyers S. L., Goemann H.M, Peyton B. M., Gardner R. D. Microalgae, soil and plants: a critical review of microalgae as renewable resources for agriculture // Algal Research. 2021. Vol. 54. No. 5. P. 102–200. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102200.
6. Sycheva M. V., Torshkov A. A., Zobikov A. E., Nemtseva N. V. Physiological and biochemical status of broiler chickens fed diets supplemented with *Chlorella vulgaris* Beijer. IPPASC-2014/1 // Izvestia Orenburg State Agrarian University. 2019. Vol. 77. No. 3. P. 219–222.
7. Zhondareva Ya. D., Trenkshu R. P. Characteristics of heterotrophic growth of *Phaeodactylum tricorutum* in batch culture // Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry. 2022. Vol. 8. No. 3. P. 57–67.
8. Stukolova I. V., Trenkshu R. P. The main types of algae nutrition (short glossary) // Issues of modern algology. 2020. No. 1. P. 34–38. DOI: 10.33624/2311-0147-2020-1(22)-34-38.
9. Trenkshu R. P., Zhondareva Ya. D. Lag-period of *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin during the transition on heterotrophic type of food // Issues of modern algology. 2017. No. 1. [Electronic resource]. Access point: <http://algology.ru/1141> (reference’s date 25.10.2024).
10. Bhatnagar A., Bhatnagar M., Chinnasamy S., Das K. C. *Chlorella minutissima* – a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 161. P. 523–536. DOI: 10.1007/s12010-009-8771-0.
11. Saratale R. G., Saratale G. D., Chang J. S., Govindwar S. P. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review // Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2011. Vol. 42. P. 138–157. DOI: 10.1016/j.jtice.2010.06.006.
12. Subashchandrabose S. R., Ramakrishnan B., Megharaj M., Venkateswarlu K., Naidu R. Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive biological agents for organic pollutant degradation // Environment International. 2013. Vol. 51. P. 59–72. DOI: 10.1016/j.envint.2012.10.007.
13. Mahapatra D. M., Chanakya H. N., Ramachandra T. V. Bioremediation and lipid synthesis through mixotrophic algal consortia in municipal wastewater // Bioresource technology. 2014. Vol. 168. P. 142–150. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.130.
14. Borisova E. V. Species composition of bacteria accompanying microalgae in culture (literature review) // Algology. 1996. Vol. 6. No. 3. P. 303–313.
15. Ignatenko M. E., Nemtseva N. V. Mechanisms of interaction of autotrophic and heterotrophic components in algobacterial communities // Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. 2012. No. 3. [Electronic resource]. Access point:

<http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-3%20/Articles/7IgnatenkoME.pdf> (reference's date 25.10.2024).

16. Paul C., Pohnert G. Interactions of the algicidal bacterium *Kordia algicida* with diatoms: regulated protease excretion for specific algal lysis // PLoS One. 2011. Vol. 1. No. 6. P. 21–32. DOI: 10.1371/journal.pone.0021032.
17. Tamiya H. Mass culture of algae // Annual Review of Plant Physiology. 1957. Vol. 8. P. 309–334. DOI: 10.1146/annurev.pp.08.060157.001521.
18. Zhondareva Ya. D., Trenkenshu R. P., Gorbunova S. Yu. Growth of *Tetraselmis viridis* Rouch. in batch culture with different carbon supply // Scientific Notes of V. I. Vernadsky Crimean Federal University. Biology. Chemistry. 2022. Vol. 8. No. 1. P. 95–103.
19. Merzlyak M. N., Naqvi K. R. On recording the true absorption spectrum and the scattering spectrum of a turbid sample: application to cell suspensions of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Photochem. Photobiol B: Biology. 2000. Vol. 58. P. 123–129. DOI: 10.1016/s1011-1344(00)00114-7.
20. Chernyshev D. N., Gorbunova S. Yu., Trenkenshu R. P. Decomposition of cultural absorption spectra and the acetone extract of microalgae *Tetraselmis viridis* into spectrum of individual pigments // Russian Journal of biological physics and chemistry. 2020. Vol. 5. No. 2. P. 232–238.
21. Lee S. S., Furman J. A. Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton // Applied and Environmental Microbiology. 1987. Vol. 53. No. 6. P. 1298–1303. DOI: 10.1128/aem.53.6.1298-1303.1987.
22. Troitsky A. S., Sorokin Yu. I. On the methodology for calculating the biomass of bacteria in water bodies // Proceedings of the Institute of Biology of Inland Waters. 1967. Iss. 15. P. 85–90.
23. Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Trenkenshu R. P., Vyalova O.Yu. Growth and biochemical characteristics of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler under different conditions of nitrogen nutrition // Ecologiya morya. 2002. Vol. 62. P. 61–66.
24. Jallet D., Caballero M. A., Gallina A. A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricorutum* grown in a sinusoidal light regime // Algal Research. 2016. Vol. 18. P. 51–60. DOI: 10.1016/j.algal.2016.05.014.
25. Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Novikova T. M. Linear growth of marine microalgae culture // Marine Biological Journal. 2018. Vol. 3. No. 1. P. 53–60. DOI: 10.21072/mbj.2018.03.1.06.
26. Wu H., Li T., Lv J., Chen Z., Wu J., Wang N., Wu H., Xiang W. Growth and biochemical composition characteristics of *Arthrospira platensis* induced by simultaneous nitrogen deficiency and seawater-supplemented medium in an outdoor raceway pond in winter // Foods. 2021. Vol. 10. Art. No. 2974. DOI: 10.3390/foods10122974.
27. Borovkov A. B., Gudvilovich I. N., Lelekov A. S., Avsiyan A. L. Effect of specific irradiance on productivity and pigment and protein production of *Porphyridium purpureum* (Rhodophyta) semi-continuous culture // Bioresource Technology. 2023. Vol. 374. Art. No. 128771. DOI: 10.1016/j.biortech.2023.128771.
28. Kamyab H., Din M. F., Hosseini S. E., Ghoshal S. K., Ashokkumar V., Keyvanfar A., Shafaghat A., Lee C. T., asghar Bavafa A., Abd Majid M. Z. Optimum lipid production using agro-industrial wastewater treated microalgae as biofuel substrate // Clean Techn Environ Policy. 2016 Vol. 18. No 8. P. 2513-2523. DOI: 10.1007/s10098-016-1212-1.
29. Dario P. P., Balmant W., Lirio F. R., Ramos L.P. Lumped intracellular dynamics: mathematical modeling of the microalgae *Tetrademus obliquus* cultivation under mixotrophic conditions with glycerol // Algal Research. 2021. Vol. 57. Art. No. 102344. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102344.
30. Perez-Garcia O., Escalante F. M., de-Bashan L. E., Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products // Water Res. 2011. Vol. 45. P. 11–36. DOI: 10.1016/j.watres.2010.08.037.
31. Zavarzin A. A., Kharazova A. D., Molitvin M. N. Cell biology: general cytology: textbook. St. Petersburg: St. Petersburg University Publ., 1992. 320 p.
32. Sakevich A. I. Exometabolites of freshwater algae. Kyiv: Naukova Dumka, 1985. 199 p.
33. Danger M., Oumarou C., Benest D., Lacroix G. Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton // Functional Ecology. 2007. Vol. 21. P. 202–210. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2006.01222.x.
34. Rylkova O. A., Polikarpov I. G. Seasonal dynamics and spatial distribution of structural indicators of the bacterioplankton community of Sevastopol Bay (the Black Sea) // Marine Biological Journal. 2021. Vol. 6. No. 1. P. 82–101. DOI: 10.21072/mbj.2021.06.1.07.

UDC 574.55 [57.084.1: 579.23]

Zhondareva Ya. D., Rylkova O. A., Doroshenko Yu. V., Nikolaychuk N. A., Lelekov A. S.

PRODUCTION CHARACTERISTICS OF THE GROWTH OF *CHLORELLA VULGARIS* AND ASSOCIATED MICROBIOTA UNDER DIFFERENT TYPES OF NUTRITION

Summary. *Green microalga Chlorella vulgaris is used in agriculture and aquaculture due to its unique biochemical composition. It is a photosynthetic organism with the capacity to alter its nutritional mode in certain conditions, transitioning from autotrophic mode of nutrition to mixotrophic (assimilation of organic compounds). The use of organic sources of carbon and energy allows increasing the density of the culture and its productivity. The aim of the current research was to study the effect of photoautotrophic and mixotrophic nutrition on the production characteristics of the growth of Ch. vulgaris culture, as well as on the development of associated microbiota. The research was carried out in 2024 at the Biotechnology and Phytoresources Department – structural unit of the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS (Sevastopol). Glycerol was used as an organic source for mixotrophic cultivation. Flow cytometry, light and scanning electron microscopy were used to study the number and morphology of microalgae and associated microbiota. It was demonstrated that after the transition from photoautotrophic to mixotrophic nutrition, the average productivity of Ch. vulgaris increased sixfold, while chlorophyll a production – threefold. It was found that glycerol was used mainly as a source of carbon, rather than as energy source: the rate of biomass growth or cell concentration increased faster than the rate of chlorophyll a production. The efficiency of photobiosynthesis of the Ch. vulgaris culture grown photoautotrophically was 5.5%, while that of grown mixotrophically – 9.2 %, taking into account the energy of light. The concentration of Ch. vulgaris cells after the transition from the photoautotrophic to the mixotrophic type of nutrition increased from 17.35 to 211.65 million cells ml⁻¹; the growth rate increased by 11 times. The total number of microbiota accompanying the Ch. vulgaris culture in the phototrophic area of microalgae growth was 12.05–95.55 million cells ml⁻¹, after the addition of glycerol this indicator increased to 159.12–319.26 million cells·ml⁻¹; the growth rate of the associated bacteria increased by more than 13 times. Two groups of cells with different DNA content were identified in the bacterial associate. The maximum values of bacteria with the high DNA content (88%) were observed during the stationary phase of mixotrophic growth. Glycerol and microalgae metabolites contributed to the active development of the microbiota. Evaluation of the ratio of Ch. vulgaris biomass and bacterial microbiota at the stationary growth phases demonstrated that the proportion of associated bacteria was 0.07–0.27 %, which did not affect the production characteristics of the growth of Ch. vulgaris culture.*

Keywords: *Chlorella vulgaris, productivity, efficiency of photobiosynthesis, mixotrophic type of nutrition, glycerol, bacterial associate.*

Жондарева Яна Дмитриевна, младший научный сотрудник отдела Биотехнологий и фиторесурсов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»; 299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2; e-mail: yana.zhondareva@ibss-ras.ru.

Рылькова Ольга Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела Биотехнологий и фиторесурсов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»; 299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2; e-mail: ol.rylkova@ibss-ras.ru.

Дорошенко Юлия Валерьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории хемозкологии отдела радиационной и химической биологии, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»; 299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2; e-mail: doroshenko_yuv@ibss-ras.ru.

Николайчук Наталья Александровна, магистр кафедры «Физика» профиль Биофизика, ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», 299053, Россия, г. Севастополь, ул. Университетская 33; e-mail: Nikolaychuk1.nata@mail.com.

Лелеков Александр Сергеевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела Биотехнологий и фиторесурсов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»; 299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2; e-mail: a.lelekov@ibss.su.

Zhondareva Yana Dmitrievna, junior researcher of biotechnology and phytoresources Department, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS; 2, Nakhimova Av., Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: yana.zhondareva@ibss-ras.ru

Rylkova Olga Aleksandrovna, Cand. Sc. (Biol.), senior researcher of biotechnology and phytoresources Department, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS; 2, Nakhimova Av., Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: ol.rylkova@ibss-ras.ru

Doroshenko Yuliya Valerievna, Cand. Sc. (Biol.), researcher of the Laboratory of chemoeology of radiation and chemical biology Department, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS; 2, Nakhimova Av., Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: doroshenko_yuv@ibss-ras.ru

Nikolaychuk Natalia Aleksandrovna, Master of the Department of physics, profile Biophysics, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education “Sevastopol State University”; 33, Universitetskaya str., Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: Nikolaychuk1.nata@mail.com.

Lelekov Aleksandr Sergeevich, Dr. Sc. (Biol.), senior researcher of biotechnology and phytoresources Department, A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS; 2, Nakhimova Av., Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov@ibss.su.

Работа выполнена в рамках государственных заданий ФИЦ ИнБЮМ по темам «Комплексное исследование экологических и физиолого-биохимических особенностей микроводорослей различных таксономических групп при адаптации к меняющимся условиям среды» (№ гос. регистрации 124021300070-2) и «Изучение биогеохимических закономерностей радиоэкологических и хемозкологических процессов в экосистемах водоемов Азово-Черноморского бассейна в сравнении с другими акваториями Мирового океана и отдельными водными экосистемами их водосборных бассейнов для обеспечения устойчивого развития на южных морях России» (№ гос. регистрации 124030100127-7).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Дата поступления в редакцию – 09.08.2024.

Дата принятия к печати – 30.10.2024.