

К ВОПРОСУ О ВЛИЯНИИ УЛЬТРАЗВУКА НА ПРОЦЕСС КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA VULGARIS*

М.С. Темнов, В.О. Миленина, А.К. Брянкина, К.И. Меронюк, Д.С. Дворецкий

Тамбовский государственный технический университет, Тамбов, Россия

Биомасса микроводорослей *Chlorella* является перспективным сырьем для получения пищевых добавок, кормов для сельскохозяйственных животных, медицинских и косметических препаратов, энергоносителей [1]. Эти микроорганизмы в процессе жизнедеятельности для роста и размножения используют энергию света и небольшое количество минеральных солей. В настоящее время наиболее развито периодическое культивирование микроводорослей, которое позволяет получить значительную продуктивность по биомассе, которая превосходит продуктивность высших растений, однако потенциальные возможности этих фотосинтетических микроорганизмов гораздо выше [2]. Рост клеток микроводорослей при периодическом промышленном культивировании ограничен рядом лимитирующих факторов, одним из которых является возникающее при высоких концентрациях в суспензии клеток микроводорослей накопление в культуральной жидкости метаболитов фенольной природы, ингибирующих рост клеток [2]. Вещества фенольной природы могут оказывать ингибирующее воздействие на фиксацию углерода, скорость роста и биосинтез некоторых метаболитов. Так, в работе [3] было выявлено значительное снижение скорости роста, активности нитратредуктазы, содержания хлорофиллов (а и b), общего белка и углеводов у микроводорослей *Chlorella vulgaris* и *Scenedesmus bijugatus* в условиях фенольного стресса. После воздействия фенола на клетки микроводорослей наблюдались некоторые ультраструктурные изменения, такие как исчезновение или сморщивание ядрышек, утолщение клеточной стенки и повреждение хлоропластов.

При этом, в исследовании [4] было выявлено, что воздействие низкочастотного ультразвука (20 кГц) мощностью 125 Вт в течение 180 мин вызвало снижение концентрации фенолов в сточных водах на 10–20 %. Причем, если в воде присутствуют ионы Fe^{2+} в концентрациях всего 10^{-3} г/л, скорость сонолитического разложения обычно увеличивается более чем в 2,5 раза. Предположительно, расщепление фенолов было связано с протеканием свободнорадикальных реакций с участием гидроксильных радикалов и пероксида водорода, которые образовывались в результате гидролиза воды, и/или реакций пиролиза вблизи кавитационных пузырьков. В составе большинства питательных сред, используемых для культивирования микроводорослей, присутствует источник катионов железа (сульфат железа (II)), которые необходимы для функционирования большого количества ферментов и соответственного эффективного протекания реакций метаболизма клеток микроводорослей. В связи с этим, можно ожидать, что воздействие низкочастотного ультразвука (20–30 кГц) может оказать стимулирующее воздействие на рост и размножение клеток микроводорослей рода *Chlorella*.

Цель работы – исследование влияния воздействия низкочастотного ультразвука на процесс периодического культивирования микроводорослей рода *Chlorella*.

Культивирование штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W. Krauss), полученного из коллекции микроводорослей и цианобактерий Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, осуществлялось в фотобиореакторе (2 л) при аэрации газовой смеси с концентрацией углекислого газа 0,03 % (расход $(3 \pm 0,5)$ л/мин) на среде Тамия в течение 26 суток при температуре 30 ± 1 °C и уровне фотосинтетически активной радиации (ФАР) $125 \pm 0,1$ мкмоль фотонов / (м² с).

Образцы, обрабатывались ультразвуком (УЗ) частотой 20–25 кГц при помощи ультразвукового дезинтегратора Scientz PD, начиная с первого дня культивирования. Мощность и продолжительность воздействия ультразвукового излучения, которым обрабатывались экспериментальные образцы, представлены в табл. 1.

Исследуемые образцы контролировались по содержанию в суспензии живых и погибших клеток, нитрат-анионов и фосфат-анионов. Измерение концентрации клеток в суспензии микроводорослей проводилось методом прямого подсчета в камере Горяева с использованием биологического микроскопа Levenhuk 320 Series согласно методикам [5]. Измерение концентрации нитрат-анионов в культуральной жидкости проводилось спектрофотометрическим методом согласно методике [6]. Определение концентрации фосфат-анионов проводилось фотометрическим методом с восстановлением аскорбиновой кислотой [7].

Таблица 1 – Условия обработки экспериментальных образцов ультразвуком

Образец	Образец 1 (Контроль)	Образец 2	Образец 3	Образец 4
Мощность УЗ, Вт	–	20	160	300
Время, с		60	60	60
Удельная энергия, Дж/мл		4,8	38,4	72

Эксперимент проводился в трех повторениях, и полученные значения являются средними для трех независимых экспериментов. Статистический анализ проводился с использованием SPSS (статистический пакет для социальных наук) версии 20.0. Существенные различия между средними значениями показателей определяли с помощью одностороннего дисперсионного анализа ANOVA и Post-Нос теста Тьюки при уровне значимости $p < 0,05$.

Анализ экспериментальных данных (табл. 2) показал, что характер кривых роста клеток всех образцов идентичен, но есть существенные различия в величине максимальной концентрации клеток, достигаемой в процессе культивирования. В эксперименте в качестве источника углерода использовалась газовоздушная смесь с содержанием углекислого газа 0,03 %, в связи с чем длительность жизненного цикла клеток составляла в среднем 3 суток (приблизительно 72 ч) [5]. Было замечено (табл. 2), что на первом жизненном цикле культивируемых клеток (0–3 сутки культивирования) у образцов, обработанных ультразвуком, наблюдаются в среднем на 10–20 % более высокая удельная скорость роста клеток по сравнению с контрольным образцом ($\mu = 0,60 \text{ сут}^{-1}$). Это объясняется более эффективным усвоением нитратов из питательной среды: удельная скорость поглощения нитратов у образцов, обработанных ультразвуком, была выше в среднем на 30–40 % по сравнению с контрольным образцом (табл. 2). Это позволяет сделать вывод о том, что ультразвуковое излучение оказывает на функционирование MFC-транспортера нитратов (NCBI-ProteinID: XP_005844791). На данном этапе культивирования (цикл жизнедеятельности клеток 1 (0–3 сутки)) количество фенольных соединений в культуральной жидкости не велико, в связи, с чем активность транспортера увеличивается за счет теплового эффекта ультразвука. Тепловой эффект создается за счет частичного поглощения энергии ультразвука молекулами в результате трения и релаксации. Такое локальное повышение температуры ускоряет перенос нитратов внутрь клетки, но мало влияет на эффективность работы переносчика фосфатов, что подтверждается результатами экспериментов (табл. 2). Наибольшее количество погибших клеток ($1,50 \pm 0,11 \text{ млн кл/мл}$) на первом цикле жизнедеятельности клеток наблюдалось у образца 4 (мощность 300 Вт, удельная энергия 72 Дж/мл), которому сообщалось максимальное количество энергии, вызывающее дезинтеграцию клеток; остальные образцы, обработанные ультразвуком, также содержали погибшие клетки, но их количество статистически значимо не отличалось от контрольного образца ($1,00 \pm 0,07 \text{ млн кл/мл}$ у контрольного образца и образцов 2 и 3). Второй цикл жизнедеятельности клеток (3–6 сутки) характеризуется максимальными величинами удельной скорости роста клеток для всех образцов, причем статистически значимых отличий от контроля не наблюдалось (табл. 2). При этом, в суспензии растет концентрация внеклеточных нитратов, что, по-видимому, связано с разрушением клеток, погибших на предыдущем жизненном цикле (0–3 сутки). Причем у образцов 2–4, которые обрабатывались ультразвуком, удельная скорость накопления нитратов в культуральной жидкости была в среднем выше в 1,2–1,6 раза по сравнению с контрольным. Это объясняется тем, что ультразвук, вероятно, ускоряет дезинтеграцию погибших клеток микроводорослей, что способствует более быстрому выходу клеточных компонентов, в частности нитратов, в межклеточное пространство.

Наибольшая скорость потребления фосфатов на 3–6 сутки культивирования наблюдалась у контрольного образца и составляла $\mu(\text{PO}_4^{3-})_1 = -0,89 \text{ сут}^{-1}$, что на 6–20 % выше, чем у образцов 2–4, обработанных ультразвуком. Это можно объяснить тем, что внутриклеточные фосфаты из погибших клеток попадали в межклеточное пространство и компенсировали поглощение фосфатов живыми клетками, снижая среднюю удельную скорость поглощения.

На 6–9 сутки культивирования (третий цикл жизнедеятельности клеток) наблюдался рост клеток образцов 3 и 4, в то время как концентрация клеток в контрольном образце 1 и образце 2 (20 Вт, 4,8 Дж/мл) уменьшалась (табл. 2). Можно предположить, что на данном этапе культивирования в суспензии накапливается значительное количество экзометаболитов фенольной природы, которые ингибируют процессы жизнедеятельности клеток.

Таблица 2 – Результаты экспериментальных исследований

Образец	Клетки	Погибшие клетки	Нитраты	Фосфаты
Начальные концентрации (0 сутки)				
№ 1 (Контроль)	0,50 ± 0,04 млн кл/мл	0 млн кл/мл	2375,22 ± 166,27 мкг/мл	173,75 ± 6,95 мг/л
№ 2				
№ 3				
№ 4				
Удельные скорости				
Цикл жизнедеятельности клеток 1 (0–3 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,60 сут-1)	0	↓* (μ = -0,19 сут-1)	↓ (μ = -0,16 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,65 сут-1)		↓ (μ = -0,25 сут-1)	↓ (μ = -0,16 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,66 сут-1)		↓ (μ = -0,27 сут-1)	↓ (μ = -0,14 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,73 сут-1)		↓ (μ = -0,28 сут-1)	↓ (μ = -0,18 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 2 (3–6 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 1,06 сут-1)	↑ (μ = 0,90 сут-1)	↑ (μ = 0,17 сут-1)	↓ (μ = -0,89 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 1,06 сут-1)	↑ (μ = 0,54 сут-1)	↑ (μ = 0,22 сут-1)	↓ (μ = -0,71 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 1,05 сут-1)	↑ (μ = 0,90 сут-1)	↑ (μ = 0,20 сут-1)	↓ (μ = -0,83 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 1,04 сут-1)	↑ (μ = 0,40 сут-1)	↑ (μ = 0,27 сут-1)	↓ (μ = -0,84 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 3 (6–9 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↓ (μ = -0,08 сут-1)	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↔ (μ = 0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,46 сут-1)
№ 2	↓ (μ = -0,04 сут-1)	↑ (μ = 0,65 сут-1)	↔ (μ = 0,03 сут-1)	↓ (μ = -0,64 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↔ (μ = 0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,23 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↑ (μ = 0,37 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)	↓ (μ = -1,28 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 4 (9–12 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↔ (μ = 0,05 сут-1)	↓ (μ = -0,10 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)	↑ (μ = 0,35 сут-1)
№ 2	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↓ (μ = -0,19 сут-1)	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↔ (μ = -0,05 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,08 сут-1)	↔ (μ = 0 сут-1)	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,10 сут-1)	↑ (μ = 0,17 сут-1)	↓ (μ = -0,11 сут-1)	↑ (μ = 0,94 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 5 (12–15 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,18 сут-1)	↔ (μ = 0 сут-1)	↑ (μ = 0,11 сут-1)	↑ (μ = 1,96 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,47 сут-1)	↓ (μ = -0,23 сут-1)	↑ (μ = 0,08 сут-1)	↑ (μ = 0,72 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,23 сут-1)	↔ (μ = -0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,76 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,31 сут-1)	↑ (μ = 0,07 сут-1)	↑ (μ = 0,50 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 6 (15–18 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,14 сут-1)	↑ (μ = 0,30 сут-1)	↑ (μ = 0,23 сут-1)	↓ (μ = -0,11 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,17 сут-1)	↑ (μ = 0,35 сут-1)	↔ (μ = 0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,37 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,25 сут-1)	↑ (μ = 0,27 сут-1)	↔ (μ = -0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,14 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,25 сут-1)	↑ (μ = 0,45 сут-1)	↔ (μ = 0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,65 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 7 (18–21 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,16 сут-1)	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↔ (μ = -0,01 сут-1)	↓ (μ = -0,80 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↑ (μ = 0,84 сут-1)	↔ (μ = -0,04 сут-1)	↑ (μ = 0,18 сут-1)
№ 3	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↑ (μ = 1,13 сут-1)	↔ (μ = -0,02 сут-1)	↓ (μ = -0,60 сут-1)
№ 4	↑ (μ = 0,42 сут-1)	↑ (μ = 0,92 сут-1)	↓ (μ = -0,09 сут-1)	↑ (μ = 0,51 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 8 (21–24 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↑ (μ = 0,28 сут-1)	↑ (μ = 0,37 сут-1)	↓ (μ = -0,06 сут-1)	↑ (μ = 0,25 сут-1)
№ 2	↑ (μ = 0,07 сут-1)	↑ (μ = 0,33 сут-1)	↓ (μ = -0,08 сут-1)	↓ (μ = -0,30 сут-1)
№ 3	↔ (μ = -0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,27 сут-1)	↓ (μ = -0,15 сут-1)	↓ (μ = -0,14 сут-1)
№ 4	↔ (μ = -0,03 сут-1)	↑ (μ = 0,16 сут-1)	↓ (μ = -0,12 сут-1)	↓ (μ = -0,10 сут-1)
Цикл жизнедеятельности клеток 9 (24–26 сутки)				
№ 1 (Контроль)	↓ (μ = -0,28 сут-1)	↔ (μ = -0,04 сут-1)	-	↔ (μ = -0,01 сут-1)
№ 2	↓ (μ = -0,41 сут-1)	↓ (μ = -0,21 сут-1)	-	↔ (μ = -0,05 сут-1)
№ 3	↓ (μ = -0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,39 сут-1)	-	↓ (μ = -0,20 сут-1)
№ 4	↓ (μ = -0,24 сут-1)	↓ (μ = -0,39 сут-1)	-	↑ (μ = 0,08 сут-1)
* условные обозначения: ↓ – уменьшение концентрации; ↑ – увеличение концентрации; ↔ – концентрация статистически значимо не поменялась				

Ультразвуковое воздействие высокой мощности 160 Вт (образец 3) и 300 Вт (образец 4) сообщает в обрабатываемую среду достаточное количество энергии (38,4 Дж/мл для образца 3 и 72 Дж/мл для образца 4), которое (при наличии катализаторов Fe^{2+}) разрушает фенольные экзометаболиты. В связи с этим, на 9-е сутки культивирования появляются статистически значимые различия между ростом

образцов 1 (контроль), 2 и образцами 3,4. На 9–10 сутки культивирования в суспензии микроводорослей, культивируемой в условиях образца 2 (20 Вт, 4,8 Дж/мл) наблюдалось значительное количество погибших клеток (35–40 млн кл/мл), что может быть связано с воздействием фенольных соединений и усиленным воздействием ультразвука. В результате таких стрессовых условий разрушилось большое количество клеток (более 50 % через 2 дня культивирования), таким образом в культуральную жидкость попало большое количество катионов металлов, которые стимулировали каталитическое расщепление фенольных экзометаболитов под действием ультразвука. Это привело к значительному увеличению средней удельной скорости роста клеток образца 2 на пятом цикле жизнедеятельности ($\mu = 0,47 \text{ сут}^{-1}$), что в 2,6 раза выше, по сравнению с контрольным образцом. На 15 сутки минимальная концентрация клеток в суспензии наблюдалась у контрольного образца 1 (132 млн кл/мл), что статистически значимо отличалось от образца 2 (218 млн кл/мл) и образцов 3 (235 млн кл/мл) и 4 (278 млн кл/мл). Максимальная концентрация клеток у образца 1 (контроль) наблюдается на 24 сутки и составляет 725 млн кл/мл, что в 2,3 раза меньше максимальной концентрации клеток образца 2 – $1655,00 \pm 115,85$ млн кл/мл, наблюдаемой на 22 сутки, и в 2,1 раза и 2,4 ниже максимальной концентрации клеток (21 сутки культивирования) у образца 3 – $1536,50 \pm 107,56$ млн кл/мл) и образца 4 – $1752,50 \pm 122,68$ млн кл/мл.

В результате проведенных экспериментальных исследований установлено, что воздействие низкочастотного ультразвука (20–30 кГц) мощностью 20–300 Вт в течение 60 с оказывает статистически значимое стимулирующее воздействие на рост и размножение клеток микроводорослей рода *Chlorella*.

Литература

1. Вопросы разработки эффективной биотехнологии синтеза ценных компонентов из биомассы микроводорослей / Д.С. Дворецкий, М.С. Темнов, И.В. Маркин [и др.] // Теоретические основы химической технологии. – 2022. – Т. 56, № 4. – С. 418–433.
2. Цоглин, Л.Н. Биотехнология микроводорослей / Л.Н. Цоглин, Н.А. Пронина. – М: Научный мир, 2012. – 184 с.
3. Megharaj, M. Effects of phenolic compounds on growth and metabolic activities of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil / M. Megharaj, H.W. Pearson, K. Venkateswarlu // Plant and Soil. -1992. – Vol. 140, № 1. – P. 25–34.
4. Papadaki, M. Sonocatalytic oxidation processes for the removal of contaminants containing aromatic rings from aqueous effluents / M. Papadaki // Separation and Purification Technology. – 2004. – Vol. 34, № 1. – P. 35–42.
5. Митрошина, Е.В. Определение жизнеспособности клеточных культур: учебно-методическое пособие / Е.В. Митрошина, Т.А. Мищенко, М.В. Ведунова. – Нижний Новгород: ННГУ, 2015. – 21 с.
6. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures / Y. Collos, F. Mornet, A. Sciandra [et al.] // Journal of Applied Phycology. – 1999. – Vol. 11, № 2. – P. 179–184.
7. ПНД Ф 14.1:2.4.112–97. Количественный химический анализ вод. Методика измерений массовой концентрации фосфат-ионов в питьевых, поверхностных и сточных водах фотометрическим методом с молибдатом аммония. – Москва: ФБУ «ФЦАО», 2010. – 26 с.