

Методика экспресс-определения численности культур микроводорослей рода *Tetraselmis*

DOI

Аспирант **Л.А. Боцун** –
Ведущий инженер лаборатории
динамики морских экосистем
ORCID ID - 0000-0002-2098-
3951; SPIN - 2283-7592

Кандидат биологических наук,
Научный сотрудник

Ж.В. Маркина – научный
сотрудник лаборатории
клеточных технологий
ORCID ID - 0000-0001-7135-
1375; SPIN - 7056-0032

Кандидат биологических наук,
доцент **С.И. Масленников** –
старший научный сотрудник
лаборатории динамики морских
экосистем ORCID ID - 0000-
0003-4776-0624;
SPIN - 9151-6468

Национальный научный центр
морской биологии

им. А. В. Жирмунского,

Дальневосточное отделение
Российской академии наук

@ 3615-x@mail.ru;

zhannav@mail.ru; 721606@mail.ru

THE METHOD OF EXPRESS DETERMINATION OF THE NUMBER OF MICROALGAE CULTURES OF THE GENUS *TETRASELMIS*

PhD student L.A. Botsun – Lead Engineer of the Marine Ecosystem Dynamics Laboratory
ORCID ID - 0000-0002-2098-3951; SPIN - 2283-7592

Candidate of Biological Sciences, Researcher Zh.V. Markina – Researcher at the Laboratory
of Cellular Technologies ORCID ID - 0000-0001-7135-1375; SPIN - 7056-0032

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor S.I. Maslennikov – Senior Researcher
at the Laboratory of Marine Ecosystem Dynamics ORCID ID - 0000-0003-4776-0624;
SPIN - 9151-6468 –

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center for Marine Biology, Far Eastern Branch
of the Russian Academy of Sciences

The article presents an algorithm for using spectrophotometric measurement to determine the number of cells of cultures of microalgae of the genus *Tetraselmis* filtered and unfiltered samples. The dependence "density – number of cells" is approximated by a linear equation with a high correlation coefficient, more than 75%, which confirms the high reliability of the method. The ability to measure the density of unfiltered culture samples on a spectrophotometer allows you to quickly estimate the number of cells both in the field and on an industrial scale.

Ключевые слова:

оптическая плотность, численность, культура микроводорослей, *Tetraselmis*, массовое выращивание

Keywords:

optical density, numbers, microalgae culture, *Tetraselmis*, mass cultivation



Рисунок 1. Культура микроводорослей *Tetraselmis sp* под световым микроскопом при увеличении $\times 40$

Figure 1. Culture of *Tetraselmis sp* microalgae under a light microscope at magnification $\times 40$

Одноклеточные микроводоросли – эффективные производители первичной биомассы, находящейся в основе пищевой цепи [1]. Коммерческое культивирование микроводорослей для получения биомассы началось всего 60 лет назад. Массовое производство некоторых видов было разработано в США, Израиле, Австралии, Китае и Таиланде в 1980-х го-

дах. Микроводоросли – удобный источник белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот и витаминов. Биохимический состав культур микроводорослей варьируется в зависимости от конкретного штамма и условий культивирования [2].

Микроводоросли в больших объемах используют в аквакультуре в качестве корма для культивируемых гидробионтов, при очистке сточных вод, в качестве сырья в пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве [3]. Кроме того, культуры микроводорослей обладают антибактериальными и противогрибковыми свойствами [4].

Микроводоросли культивируют как в пресной, так и в морской воде. Для культивирования в морской воде широко применяется род *Tetraselmis* (*Chlorophyta*) – известный как галотолерантный род, культуры которого можно выращивать в условиях низкой солености (от 14‰). Культуры *Tetraselmis* характеризуются быстрыми темпами роста и способностью к поддержанию высокого уровня биомассы в течение длительного времени (рис. 1-2), что является одним из важнейших критериев культивирования [11]. При добавлении культур данных микроводорослей к живым кормам, например, артемии *Artemia salina*, содержание питательных веществ в последней увеличивалось в несколько раз [5; 6]. Культуры *Tetraselmis spp.*

демонстрируют высокие темпы роста в стрессовых условиях, устойчивость к биологической контаминации при массовом выращивании (рис. 3), в том числе – на открытых площадках (рис 4). Данные свойства культур широко используются в биотехнологии и фикобиоремедиации [12].

Технология выращивания микроводорослей подразумевает постоянный учет численности культуры. При прямом подсчете микроводорослей под световым микроскопом используют разные счетные камеры, такие как Нажотта, Горяева, Седвика-Рафтера и другие. Эти методики – очень трудоемки и подходят для подсчета микроводорослей в небольших объемах, что неудобно при использовании в полевых и промышленных условиях [7; 8]. Выходом из ситуации является применение спектрофотометрического метода, основанного на замере оптической плотности культуры, который отличается быстротой, высокой чувствительностью и не требует специальной подготовки [9].

Цель работы заключается в проверке возможности применения спектрофотометрического метода, для быстрого подсчета численности клеток в культурах микроводорослей *Tetraselmis spp.*, и сравнение оптической плотности и численности клеток в пробах фильтрованной и нефильтрованной культуры микроводорослей в период проведения эксперимента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В эксперименте были исследованы культуры микроводорослей *Tetraselmis striata* (Butcher), *Tetraselmis vitidis* (Butcher), *Tetraselmis maculata* (Butcher) и *Tetraselmis sp.*

В ходе эксперимента микроводоросли выращивали при температуре 21°C на питательной среде f/2, приготовленной на стерилизованной морской воде с соленостью 32‰. Свето-темповой режим 12/12 ч, под диодной лампой с уровнем освещенности 2500 Лк. Были использованы колбы Эрленмейера с объемом культуральной среды 200 мл (рис 5). Культуру микроводорослей на экспоненциальной стадии роста использовали в качестве инокулята. Продолжительность эксперимента составляла 28 суток. Пробы для подсчета численности клеток и определения оптической плотности отбирали на 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25 и 28 сутки опыта. Эксперимент проводился в трех биологических повторностях, с тремя начальными численностями клеток: 1) 13×10^3 кл/мл; 2) 25×10^3 кл/мл; 3) 51×10^3 кл/мл. для каждого вида. Всего использовано 36 проб. Для применимости предлагаемого метода подсчета, непосредственно в культурах кормовых организмов, были измерены пробы, профильтрованные через нейлоновый газ с ячейей 29 мкм. Нефильтрованные – культуры, выращенные в ваннах и бассейнах на открытых площадках. Фильтрованная культура получалась после пропускания через нейлоновую сетку с ячейей 29 мкм. Измерение нефильтрованных культур позволяет упростить пробоподготовку и увеличить количество замеров. Отдельная задача была в сравнении оптической плотности фильтрованных и нефильтрованных культур микроводорослей.

В статье представлен алгоритм применения спектрофотометрического измерения, для определения численности клеток культур микроводорослей рода *Tetraselmis*, фильтрованных и нефильтрованных проб. Зависимость «плотность – численность клеток» аппроксимируется линейным уравнением, с высоким коэффициентом корреляции – более 75%, что подтверждает высокую достоверность метода. Возможность измерения плотности нефильтрованных проб культуры на спектрофотометре позволяет получить быструю оценку численности клеток как в полевых условиях, так и в промышленных масштабах.

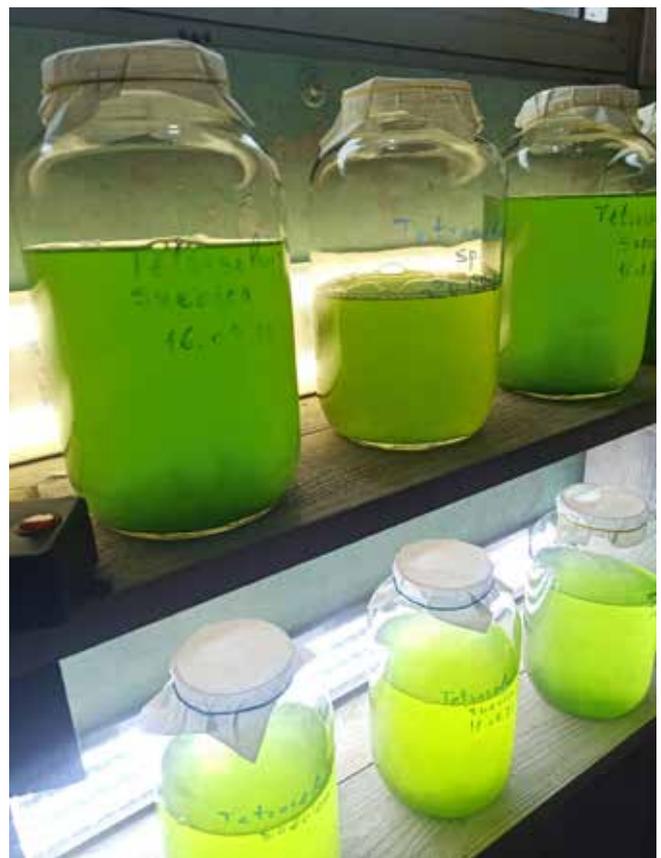


Рисунок 2. Стартовая культура микроводорослей *Tetraselmis sp.* в 4-хлитровых емкостях

Figure 2. Starting culture of *Tetraselmis sp.* microalgae in 4-liter containers

Подсчет численности клеток культур производили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter, США). Для анализа в течение каждого измерения записывали 20000 событий (регистрируемых в пробе частиц). Выбор клеток водорослей из общего числа событий, детектируемых цитометром, проводили по флуоресценции хлорофилла а. Интенсивность флуоресценции хлорофилла а регистрировали на длине волны 690 нм, длина волны возбуждения составляла 488 нм, (для проточного цитометра CytoFLEX канал регистрации данных – PC 5.5).

Определение оптической плотности на длине волны 750 нм (OD_{750}) [10] проведено с помощью



Рисунок 3. Выращивание культуры *Tetraselmis sp.* в лабораторных условиях при искусственном освещении

Figure 3. Growing *Tetraselmis sp.* culture in laboratory conditions under artificial lighting

спектрофотометра ПЭ-5400ВИ (Экрос, Россия) в стеклянных кюветках с оптическим путем 10 мм (рис. 6).

Статистическую обработку выполняли с помощью программы Excel.

На рисунках 7-14 представлены зависимости оптической плотности культур от численности клеток в культуре. Во всех случаях зависимость аппроксимируется линейным уравнением $y = ax + b$.

В фильтрованных пробах культур *T. Striata*, при начальных численностях клеток 13×10^3 кл/мл, 25×10^3 кл/мл и 51×10^3 кл/мл, средние коэффициенты достоверности линейного уравнения составляли 93, 94, 96%.

В нефильтованной культуре *T. Striata*, при тех же начальных численностях, средние коэффициенты достоверности составляли 92, 93, 97%, отличаясь в среднем на 1% от показателей фильтрованных проб.



Рисунок 4. Выращивание культуры *Tetraselmis sp.* на открытой площадке

Figure 4. Growing *Tetraselmis sp.* culture in an open area

Для *T. maculata* в фильтрованных пробах средний коэффициент достоверности уравнений составлял, соответственно, 77, 83, 89%. В нефильтованных пробах средний коэффициент достоверности отличался на 3,3%, составляя, соответственно, 75, 81 и 83%.

В фильтрованных пробах *T. viridis* средний коэффициент достоверности линейного уравнения показывает 85, 86 и 86%. В нефильтованных пробах средний коэффициент достоверности составлял 84, 86 и 88%, отличаясь в среднем на 1%.



Рисунок 5. Экспериментальные культуры *Tetraselmis spp.* в аквариальной ННЦМБ ДВО РАН

Figure 5. Experimental cultures *Tetraselmis* in the aquarium NSCMB FEB RAS



Рисунок 6. Измерение на оптической плотности на спектрофотометре Экрос

Figure 6. Measurement of optical density on the Ekros spectrophotometer

В фильтрованных пробах для *Tetraselmis sp.* средний коэффициент достоверности составлял 89, 94 и 95%. В нефильтованных пробах зависимость аппроксимируется уравнением с коэффициентами достоверности 88, 93 и 95%, отличаясь в среднем на 0,6%.

Коэффициенты линейного уравнения $y = ax + b$ для фильтрованных и нефильтованных проб указаны в таблице 1, y – численность клеток $\times 10^3$ в мл, x – оптическая плотность, измеренная на длине волны 750 нм.

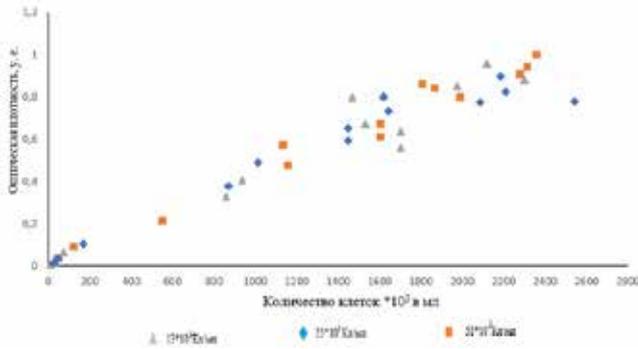


Рисунок 7. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis striata* (фильтрованные пробы)

Figure 7. Dependence of the optical density of the culture on the number of culture cells for *Tetraselmis striata* (filtered samples)

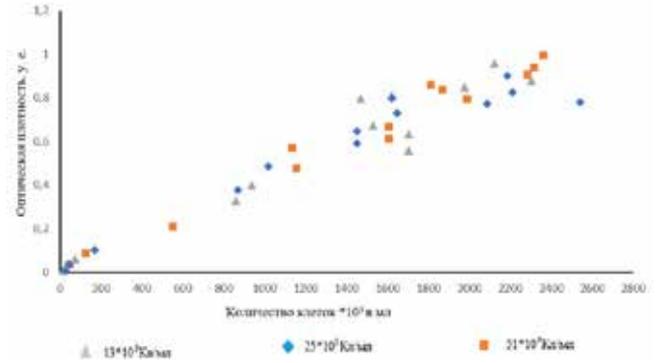


Рисунок 8. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis striata* (нефильтрованные пробы)

Figure 8. Dependence of the optical density of the culture on the number of culture cells for *Tetraselmis striata* (unfiltered samples)

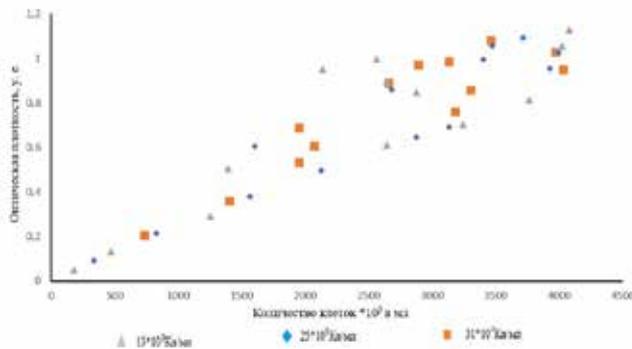


Рисунок 9. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis maculata* (фильтрованные пробы)

Figure 9. Dependence of the optical density of culture on the number of culture cells for *Tetraselmis maculata* (filtered samples)

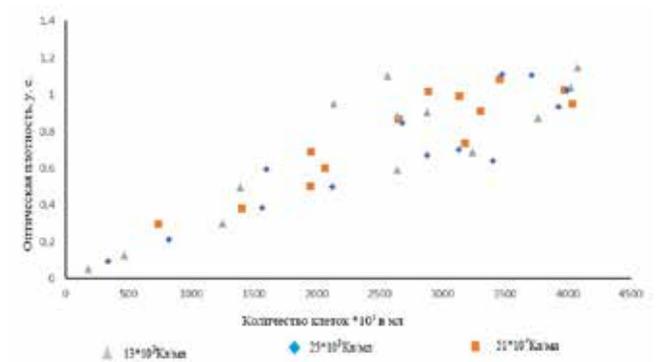


Рисунок 10. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis maculata* (нефильтрованные пробы)

Figure 10. Dependence of the optical density of culture on the number of culture cells for *Tetraselmis maculata* (unfiltered samples)

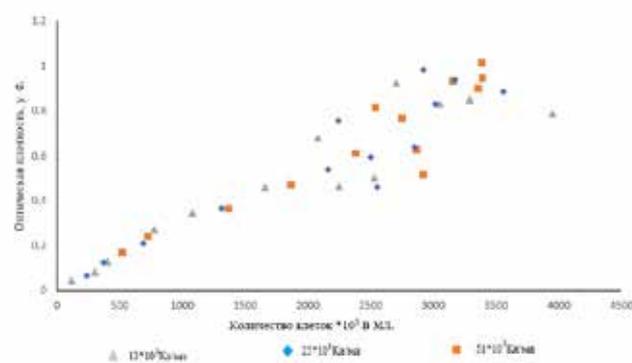


Рисунок 11. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis viridis* (фильтрованные пробы)

Figure 11. Dependence of the optical density of culture on the number of culture cells for *Tetraselmis viridis* (filtered samples)

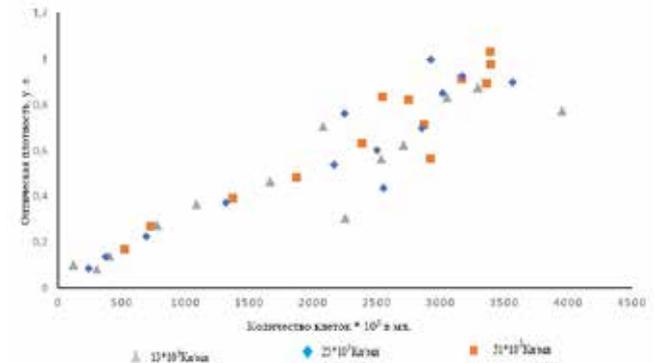


Рисунок 12. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis viridis* (нефильтрованные пробы)

Figure 12. Dependence of the optical density of culture on the number of culture cells for *Tetraselmis viridis* (unfiltered samples)

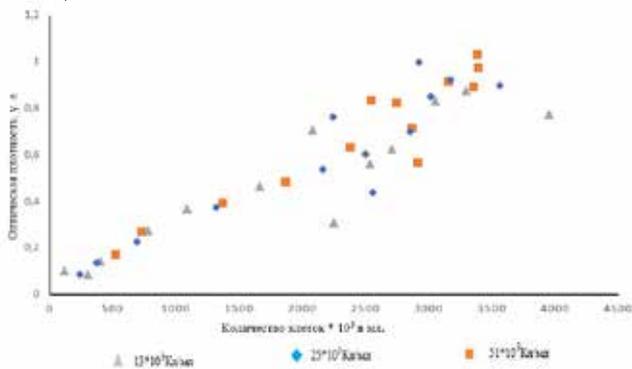


Рисунок 13. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis sp.* (фильтрованные пробы)

Figure 13. The dependence of the optical density of the culture on the number of the culture cells for *Tetraselmis sp.* (filtered samples)

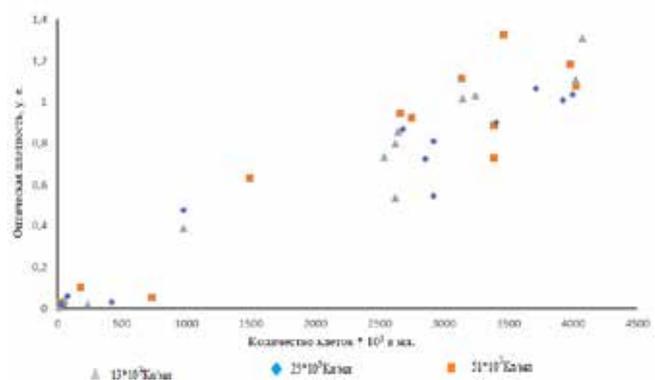


Рисунок 14. Зависимость оптической плотности культуры от численности клеток культуры для *Tetraselmis sp.* (нефильтрованные пробы)

Figure 14. The dependence of the optical density of the culture on the number of the culture cells for *Tetraselmis sp.* (unfiltered samples)

Таблица 1. Данные для пересчета линейной модели оптической плотности на численность $\times 10^3$ в мл / **Table 1.** Data for recalculation of the linear optical density model by the number of $\times 10^3$ in ml

Вид	Фильтрованные пробы		Нефильтрованные пробы	
	a	b	a	b
<i>Tetraselmis striata</i>	0,0004	0,0343	0,0004	0,0419
<i>Tetraselmis viridis</i>	0,0003	0,0367	0,0002	0,0531
<i>Tetraselmis maculata</i>	0,0003	0,0603	0,0002	0,0914
<i>Tetraselmis sp.</i>	0,0003	0,0607	0,0003	0,0233

Авторы выражают признательность сотрудникам ННЦМБ ДВО РАН Н.А. Айздайчер за поддержание живой коллекции видов микроводорослей, Л.Г. Козьменко, В.Б. Козьменко и Д.С. Борисовой за техническую помощь в проведении эксперимента. Авторы благодарны ЦКП «Морской биобанк» ННЦМБ ДВО РАН (<http://marbank.dvo.ru>) за предоставление культур *Tetraselmis striata* (MBRU_P-86), *T. vitidis*, (MBRU_PV-85) и *T. maculata* (MBRU_TM-93).

Финансирование работы. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-30004).

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Ковалев Н.Н. Культуральные и биохимические показатели микроводорослей *Phaeodactylum tricornutum* и *Tetraselmis suecica* в накопительных культурах / Н.Н. Ковалев, С.Е. Лескова, Е.В. Михеев, Ю.М. Позднякова и др. // Вестник Камчатского государственного технического университета. – 2020. – № 53. – С. 54-65.
1. Kovalev N.N. Cultural and biochemical parameters of microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Tetraselmis suecica* in accumulative cultures / N.N. Kovalev, S.E. Leskova, E.V. Mikheev, Yu.M. Pozdnyakova et al. // Bulletin of the Kamchatka State Technical University. – 2020. – No. 53. – pp. 54-65.
2. Barkia I., Saari N., Manning S.R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition // Marine drugs. – 2019. – Vol. 17(5). – P. 304.
3. Kaparapu J. Application of Microalgae in Aquaculture // Phycological Society. – 2018. – Vol. 48. – Pp. 21-26.
4. Wang G., Xu J., Zeng C. et.al. Pelagic microalgae as suitable diets for the benthic harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus* // Hydrobiologia. – 2015. – Vol. 762. – Pp. 81-88.
5. Lubzens E., Zmora O., Stottrup J. et al. Production and nutritional value of rotifers // Live feeds in marine aquaculture. – 2003. – Pp. 300-303.

6. Makridis P., Costa R.A., Dinis M.T. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chunii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii* // Aquaculture. – 2006. – Vol. 255. – Pp. 76-81.
7. Franklin N.M., Stauber J.L., Lim R.P. Development of flow cytometry-based algal bioassays for assessing toxicity of copper in natural waters // Envir. Toxicol. Chem. – 2001. – Vol. 20. – Pp. 160-170.
8. Günerken E., Hondt E.D., Eppink M. et al. Flow cytometry to estimate the cell disruption yield and biomass release of *Chlorella sp.* during bead milling // Algal Research. – 2017. – Vol. 25. – Pp. 25-31.
9. Хунджуа Д.А. Применение спектрально-оптических методов для характеристики выращенных при различных условиях микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* / Д.А. Хунджуа, А.В. Харчева, В.А. Терехова, М.М. Гладкова и др. // Процессы в геосредах. – 2015. – Т. 1. – С. 87-95.
9. Khunjua D.A. Application of spectral-optical methods for characterization of microalgae *Scenedesmus quadricauda* grown under various conditions / D.A. Khunjua, A.V. Kharcheva, V.A. Terekhova, M.M. Gladkova, etc. // Processes in geomed. - 2015. – Vol. 1. – Pp. 87-95.
10. Копытов Ю.П. Методика комплексного определения биохимического состава микроводорослей / Ю.П. Копытов, А.С. Лелеков, Р.Г. Геворгиз, М.В. Нехорошев и др. // Альгология. – 2015. – Т. 25(1). – С. 35-40.
10. Kopytov Yu.P. Method of complex determination of the biochemical composition of microalgae / Yu.P. Kopytov, A.S. Lelekov, R.G. Gevorgiz, M.V. Nekhoroshev et al. // Algologiya. – 2015. – Vol. 25(1). – Pp. 35-40.
11. Sing S.F., Isdepsky A., Borowitzka M.A. et al. Pilot-scale continuous recycling of growth medium for the mass culture of a halotolerant *Tetraselmis sp.* in raceway ponds under increasing salinity: a novel protocol for commercial microalgal biomass production // Bioresource technology. – 2014. – Vol. 161. – Pp. 47-54.
12. Pereira H., Silva J., Santos T. et al. Nutritional potential and toxicological evaluation of *Tetraselmis sp.* CTP4 microalgal biomass produced in industrial photobioreactors // Molecules. – 2019. – Vol. 24(17). – P. 3192.