

УДК 581.1

<sup>1</sup>Б.К. Заядан\*, <sup>1</sup>Ю.М. Дё, <sup>1</sup>А.А. Усербаева, <sup>1</sup>Н. Амангельды, <sup>2</sup>К. Болатхан,  
<sup>1</sup>Ф.К. Сарсекеева, <sup>3</sup>С. Портон  
<sup>1</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы  
<sup>2</sup>Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы  
<sup>3</sup>Университет колледж Лондона, Великобритания, г. Лондон  
 \*E-mail: Zayadan.Bolatkhan@kaznu.kz

### Изучение роста клеток и накопления липидов в клетках вновь выделенных штаммов микроводорослей при культивировании в различных условиях

Был изучен рост клеток и накопление липидов в клетках выделенных штаммов микроводорослей *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 при культивировании в различных условиях. Рост исследуемых штаммов микроводорослей в различных условиях культивирования оценивали методом спектрофотометрии. Установлено, что для исследуемых штаммов микроводорослей оптимальным является культивирование в миксотрофных условиях. Для индукции синтеза липидов, выделенные штаммы микроводорослей *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 культивировали в питательной среде с концентрацией азота, уменьшенной в 10 раз по сравнению со стандартной. Накопление липидов в клетках выделенных штаммов оценивали с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием флуоресцентных красителей, *Neil Red*. Выявлено, что наибольшее накопление липидов в клетках исследуемых штаммов наблюдается при росте культур на питательной среде, содержащей азота в 10 раз меньше стандартной концентрации.

**Ключевые слова:** микроводоросли, динамика роста, азотный стресс, накопление липидов, биодизельное топливо.

B.K. Zayadan, Y.M. Dyo, A.A. Userbayeva, N. Amangeldy, K. Bolathan, F.C. Sarsekeeva, C. Purton  
**Study of growth and accumulation of lipids in the newly isolated microalgal  
 strains in different culture conditions**

Cell growth and lipid accumulation in cells of isolated strains of microalgae were studied when these microalgae: *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 and *Parachlorella kessleri* Uz-1 cultured in various conditions. The growth of the studied microalgal strains was measured by spectrophotometry. The optimal conditions for growth was observed in the mixotrophic conditions. To induce the lipids synthesis in the isolated microalgal strains, it was preferable to culture in growth medium in which the concentration of nitrogen was less by 10 times compared with the standard. Accumulation of lipids in the cells of the isolates was assessed by fluorescence spectroscopy using fluorescent dyes, *Neil Red*. The highest accumulation of lipids was observed in cells of *Parachlorella kessleri* DZP-5 strains recorded in the growth condition which called "nitrogen starvation" condition.

**Keywords:** microalgae, growth dynamics, nitrogen stress, lipid accumulation, biodiesel.

Б.К. Заядан, Ю.М. Дё, А.А. Усербаева, Н. Амангелді, К. Болатхан, Ф.К. Сарсекеева, С. Портон  
**Жаңадан бөлініп алынған микробалдырлар штамдарын әртүрлі жағдайларда  
 дақылдаған кездегі клеткалар өсуі мен липидтер жинақтауын анықтау**

Жаңадан бөлініп алынған *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 және *Parachlorella kessleri* Uz-1 микробалдырлар штамдары әртүрлі жағдайларда дақылданып клеткаларының өсуі мен липидтер жинақталуы зерттелінді. Әртүрлі ортада дақылданған микробалдырлар штамдарының өсуі спектрофотометр әдісімен анықталды. Бөлініп алынған штамдардың өсуіне қолайлы орта миксотрофты жағдай болатыны анықталды.

Липид синтезінің индукциясы үшін бөлініп алынған *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 және *Parachlorella kessleri* Uz-1 микробалдырлар штамдарын азот қосылысының стандартымен салыстырғанда 10 есе аз қоректік ортада дақылданды. Бөлініп алынған штамдардың клеткаларындағы липид жинақталуын флуоресцентті бояғыш *NeilRed* арқылы флуоресцентті спектроскопиямен анықтадық. Азотқа тапшы қоректік ортада бөлініп алынған микробалдыр *Parachlorella kessleri* DZP-5 штамының липидті көп мөлшерде жинақтайтыны байқалды.

Жаңадан бөлініп алынған микробалдыр штамдарының клеткасында липидтердің көп жинақталуы қоректік ортадағы азот құрамы стандартты концентрациядан 10 есе азайған жағдайда байқалды.

**Түйін сөздер:** микробалдырлар, өсу динамикасы, азот стресі, липидтердің жиналуы, биодизельді жанармай.

## Введение

В поиске возобновляемых и углеродно-нейтральных альтернативных ископаемым видов топлива, растет интерес к использованию определенных видов микроводорослей в качестве сырья для извлечения липидов и преобразования в биодизельное топливо [1]. Около 50% фиксации мирового органического углерода, на которые приходится микроводоросли, представляют собой генетически и экологически различную группу фотосинтезирующих микроорганизмов [2, 3]. В сравнении с масличными культурами, которые в настоящее время культивируются для производства биодизельного топлива, микроводоросли могут выращиваться в промышленных масштабах без задействования пашенных земель, используя сточные воды или морскую воду. Способность к фотосинтезу, высокое содержание липидов и быстрый рост некоторых видов делают их перспективными для непрерывного производства липидов в промышленных масштабах [4].

Тем не менее в настоящее время стоимость биодизельного топлива, производимого из микроводорослей, является слишком высокой, чтобы обеспечить конкурентоспособность с обычным дизельным топливом или биодизелем растительного происхождения. Отчасти это связано с проблемой постоянного культивирования в открытых системах промышленного масштаба, в которых водоросли должны быть прекрасно адаптированы к условиям колебаний местных климатических условий и достаточно устойчивыми, чтобы быть вне конкуренции с другими инвазивными видами. Кроме того, данные культуры должны выживать в среде с многочисленными хищниками и патогенными микроорганизмами. Накопление большого количества нейтральных липидов (триацилглицеридов) в большинстве водорослей наблюдается только в условиях питательного стресса, когда рост находится под угрозой [5].

Поэтому производство липидов из микроводорослей связано с оптимизацией двух фаз – достижение максимального роста для получения биомассы и накопления большого количества липидов в клетках в период стресса (например, при истощении азота в питательной среде). К настоящему времени основной акцент делается

на такие роды морских микроводорослей, как *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* и различные диатомовые водоросли, а также пресноводные роды, такие, как *Chlorella*, которые демонстрируют высокую производительность липидов [4, 6].

Цель данной работы – изучение роста клеток и накопления липидов в клетках вновь выделенных штаммов микроводорослей при культивировании в различных условиях.

## Материалы и методы

В работе использовались культуры микроводорослей, изолированные из образцов воды и почвы, отобранных в ущелье Заилийского Алатау на Тянь-Шанском хребте к югу от города Алматы (Казахстан) и коллекционные культуры (*Parachlorella kessleri* Uz-1 Институт ботаники АН Узбекистана). Полученные альгологически и бактериологически чистые штаммы зеленых водорослей, идентифицированы как *Parachlorella kessleri* DZP-5 и *Chlorella vulgaris* K6.

Проверка способности роста на твердой среде в миксотрофных и гетеротрофных условиях проводилась на питательной среде TAP, которая содержит 17,4 мМ ацетата в качестве источника углерода. Для проверки способности к росту в миксотрофных и фототрофных условиях инкубируемые культуры находились под непрерывным освещением 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  при комнатной температуре в течение 3 дней; для проверки способности к гетеротрофному росту чашки с культурами были завернуты в алюминиевую фольгу.

Многие виды *Chlorella* способны к гетеротрофному или миксотрофному росту, используя экзогенный источник углерода (глюкоза или ацетат), и выращивание в таких условиях может влиять на липидную производительность [7]. Инокуляция культур производилась в пробирках с питательной средой Тамия [8]. Световая и флуоресцентная микроскопии проводилась с использованием EVOS цифрового флуоресцентного микроскопа (PEQLAB, Германия) с применением светового фильтра 593/40 нм.

Рост и липидный анализ был проведен при выращивании штаммов в жидкой TAP (трис-ацетат-фосфат) среде [9] при +25 °C и непрерывном освещении белым светом 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , при деликатном перемешивании (100 оборотов в минуту). Для индукции синтеза липидов концентрация азота (в виде  $\text{NH}_4^+$ ) была умень-

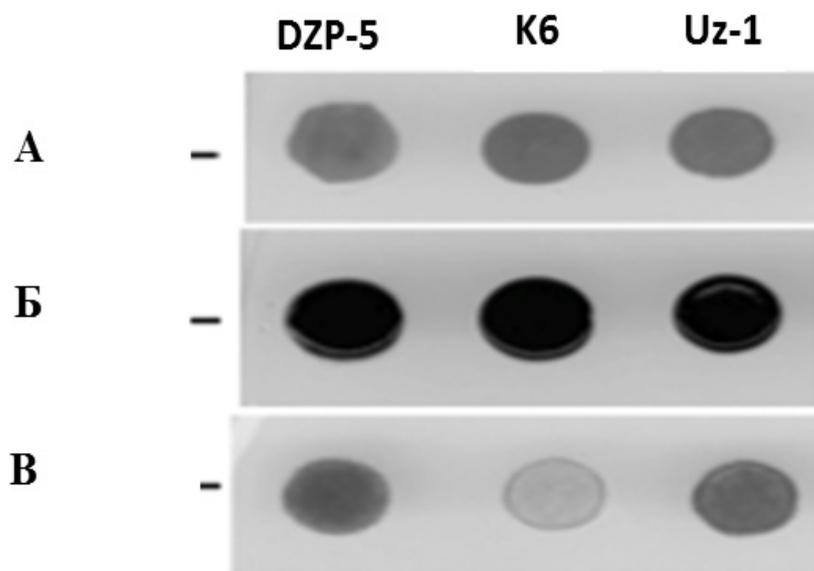
шена в десять раз с 7,48 мМ (питательная среда ТАР с высоким содержанием азота) до 0,748 мМ (питательная среда ТАР с редуцированным содержанием азота). Рост оценивали путем измерения оптических характеристик культуры при 750 нм с использованием спектрометра UNICAM UV2.

Накопление липидов при культивировании в питательной среде, обедненной азотом, оценивали с помощью флуоресцентной спектроскопии с использованием флуоресцентного красителя Nile Red. Штаммы выращивали в течение 5-ти дней на питательной среде ТАР с оптимальным и ограниченным содержанием азотного компонента. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью Perkin-Elmer LS-55 люминесцентного спектрометра с длиной волны установленным на уровне 510 нм и сканированным излучением от 520 до 800 нм [10].

## Результаты и их обсуждение

Все три исследуемых штамма микроводорослей культивировали в различных условиях: фототрофных, гетеротрофных и миксотрофных. В качестве органического источника углерода при культивировании в гетеро- и миксотрофных условиях использовали ацетат натрия.

В результате проведенных исследований установлено, что штаммы *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 способны усваивать органический источник углерода и расти быстрее, когда ацетат натрия доступен. Как показано на рисунке 1, в гетеротрофных условиях *Parachlorella kessleri* DZP-5 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 растут схожими темпами, как и в фототрофных условиях, но для *Chlorella vulgaris* K6 рост в гетеротрофных условиях ограничен.

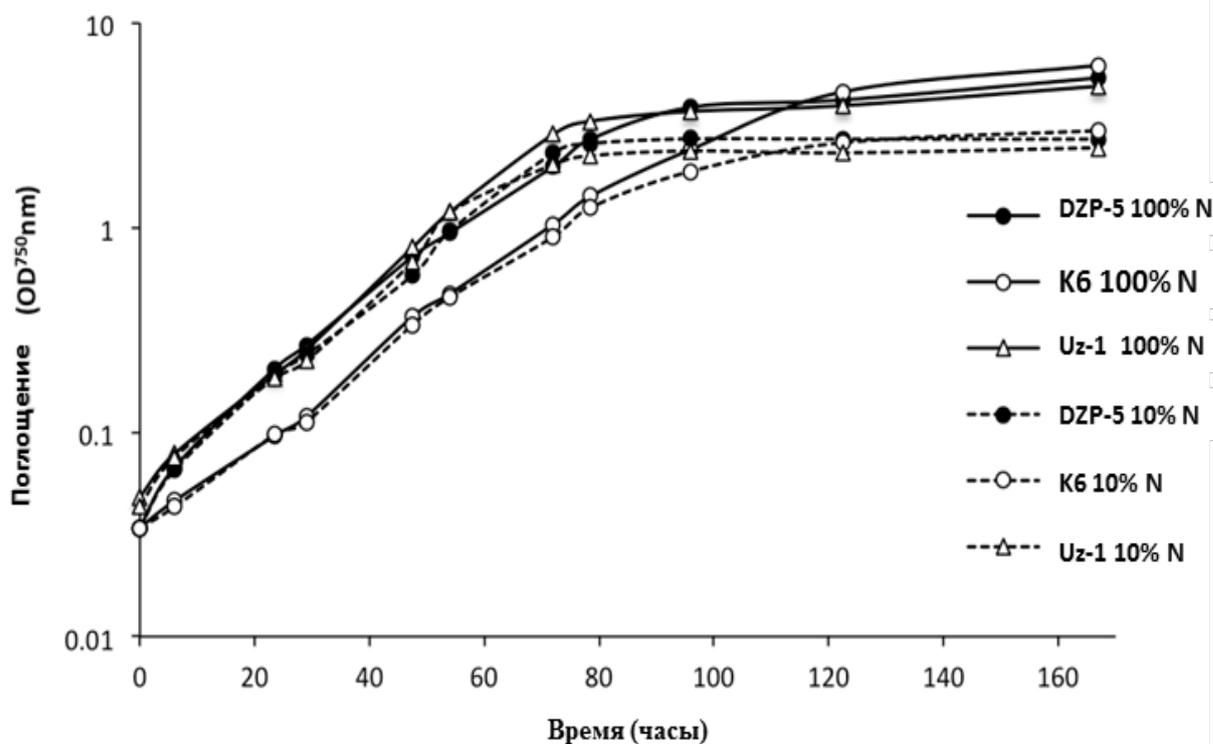


**Рисунок 1** – Культивирование штаммов *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 в фототрофных (А), гетеротрофных (Б) и миксотрофных (В) условиях

Дальнейший анализ роста проводился путем культивирования трех штаммов в двух вариантах питательной среды - содержащей оптимальный уровень азота (как  $\text{NH}_4^+$ ), или 10% от этого уровня (рис. 2).

Как показано на рис. 2, темпы роста одинаковы для всех трех штаммов с расчетным

временем удвоения около 11 часов. Однако в конце экспоненциальной фазы (около 80-100 часов) очевидно, что азот истощается в 10% N среде и рост культур, выращиваемых в данных условиях замедляется по сравнению с культурами, выращиваемыми в среде со 100% N.



**Рисунок 2** – Сравнительная динамика роста штаммов *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 при культивировании в двух вариантах питательной среды (А – оптимальный уровень азота, Б – редуцированный уровень азота)

Накопление нейтральных липидов в клетках штаммов микроводорослей *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 было продемонстрировано путем обработки суспензии клеток после 120 часов активного культивирования, липофильным флуоресцентным красителем Nile Red. Связываясь с Nile Red липиды образуют комплекс, показывая максимумы поглощения при длине волны 510 нм.

Соответственно полученным результатам анализа биомассы всех исследуемых штаммов микроводорослей, выросших на питательной среде со стандартной концентрацией азота (100% N), накопление липидов выражено в незначительном количестве. В то время как при выращивании в условиях азотного голодания количество липидов (TAGs) в клетках исследуемых штаммов резко возрастает. Максимальное накопления липидов в ответ на стрессовые условия культивирования

наблюдается у штамма *Parachlorella kessleri* DZP-5 по сравнению со штаммами *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1 (рис. 3).

Установлено, что активное накопление липидов клетками штамма *Parachlorella kessleri* DZP-5 наблюдается при культивировании на питательной среде со сниженной концентрацией азота в 10 раз, так называемом условии азотного стресса. При стандартной концентрации азота в питательной среде наблюдается увеличение показателей роста, накопление клетками большого количества липидов в этих условиях не наблюдается.

Данные эксперимента свидетельствуют, что культивирование выделенного штамма микроводоросли *Parachlorella kessleri* DZP-5 в установленных оптимальных условиях дает возможность использования его для крупномасштабного культивирования с целью производства биодизеля в Казахстане.

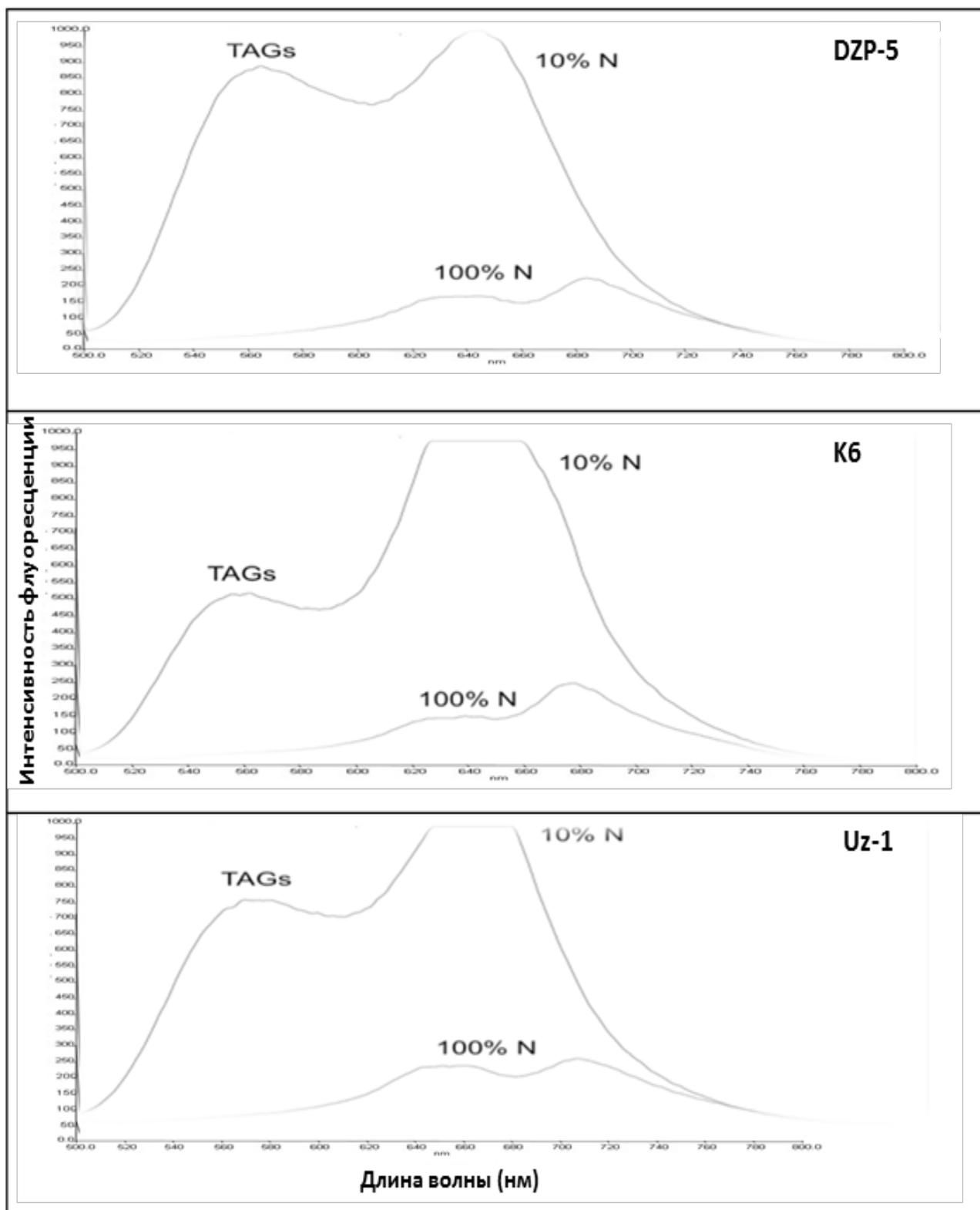


Рисунок 3 – Интенсивность флуоресценции штаммов микроводорослей *Parachlorella kessleri* DZP-5, *Chlorella vulgaris* K6 и *Parachlorella kessleri* Uz-1

---

**References**

- 1 Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T. and Falkowski P. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components // *Science*. – 1998.-Vol.- 281. - P.237-240.
- 2 Chisti Y. Biodiesel from Microalgae // *Biotechnol. Adv.*- 2007- Vol.- 25.-P. 294-306.
- 3 Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., and Darzins, A. Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances // *Plant J.* - 2008.- Vol. - 54.- P. 621-639.
- 4 Georgianna D.R. and Mayfield S.P. Exploiting Diversity and Synthetic Biology for the Production of Algal Biofuels // *Nature*.- 2012.-Vol. - 488.-P. 329-335.
- 5 Larkum A.W., Ross I.L., Kruse O. and Hankamer B. Selection, Breeding and Engineering of Microalgae for Bioenergy and Biofuel Production // *Trends Biotechnol.* - 2012. -Vol. - 30. -P. 198-205.
- 6 Malcata, F.X., Microalgae and biofuels: A Promising Partnership, *Trends Biotechnol.*, 2011, vol. 29, pp. 542-549.
- 7 Ratha S.K., Babu S., Renuka N., Prasanna R., Prasad R.B., Saxena A.K. Exploring Nutritional Modes of Cultivation for Enhancing Lipid Accumulation in Microalgae // *J. Basic Microbiol.*- 2012.-in press.
- 8 Tamiya H., Morimura M., Yorota M., and Kunieda R. Mode of Nuclear Division in Synchronous Cultures of *Chlorella*: Comparison of Various Methods of Synchronization // *Plant Cell Physiol.* – 1961. -Vol.- 2.- P. 383-403.
- 9 Vasyurenko Z.P. and Sinyak K.M. Influence of Culture Medium of the Fatty-Acid Profile in Enteric Bacteria // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*- 1979.- Vol.- 23.-P. 397-406.
- 10 Cooksey K.E., Guckert J.B., Williams S.A. and Callis P.R. Fluorometric Determination of the Neutral Lipid Content of Microalgal Cells using Nile Red // *J. Microbiol. Methods.* – 1987. -Vol.- 6.-P. 333-345.