

---

## AUXILIARY DISCIPLINES

---

DOI: <https://doi.org/10.23649/jae.2022.2.22.03>

Leskova S.E.<sup>1</sup>, Miheev E.V.<sup>2</sup>, Kovalev N.N.<sup>3</sup>\*

<sup>1, 2, 3</sup> Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, Russia

\* Corresponding author (kovalevnn61[at]yandex.ru)

Received: 20.04.2022; Accepted: 26.04.2022; Published: 20.06.2022

### GROWTH OF *ISOCHRYSIS GALBANA* IN MIXOTROPHIC CONDITIONS USING GIBBERELIC ACID

Research article

#### Abstract

The study of influence of different concentrations of gibberellic acid on growth of *Isochrysis galbana* in enrichment culture has been conducted. The growth of algae biomass was found by increasing the number of cells calculated in each experiment in three hemocytometers under a light microscope. The duration of the experiment was 8 days. Concentrations of gibberellic acid of  $0.39 \times 10^{-8}$  and  $0.79 \times 10^{-8}$  mmol/l were found to have a stimulating effect on cell growth dynamics of *I. galbana*, compared to the control group. The maximum cell growth in the culture was observed when gibberellic acid was added to concentrations of  $0.39 \times 10^{-8}$  mmol/l and was 721%. Biochemical indicators of algae culture of *I. galbana* were evaluated, with the addition of gibberellic acid in concentrations of  $0.39 \times 10^{-8}$  mml during 8 days of the experiment in comparison with the control group. Compared to the control group, an increase in the amount of protein, lipids, carbohydrates and chlorophyll in the culture of algae was established with the addition of gibberellic acid at a concentration of  $0.39 \times 10^{-8}$  mml at the time of the experiment.

**Keywords:** microalgae, cultivation, *Isochrysis galbana*, phytohormones, gibberellic acid.

Лескова С.Е.<sup>1</sup>, Михеев Е.В.<sup>2</sup>, Ковалев Н.Н.<sup>3</sup>\*

<sup>1, 2, 3</sup> Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, Владивосток, Россия

\* Корреспондирующий автор (kovalevnn61[at]yandex.ru)

Получена: 20.04.2022; Доработана: 26.04.2022; Опубликована: 20.06.2022

### РОСТ *ISOCHRYSIS GALBANA* В МИКСОТРОФНЫХ УСЛОВИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИББЕРЕЛЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Научная статья

#### Аннотация

Проведено исследование влияния различных концентраций гиббереллиновой кислоты на рост *Isochrysis galbana* в накопительной культуре. Прирост биомассы водорослей находили по увеличению числа клеток, просчитанных в каждом опыте в трех камерах Горяева под световым микроскопом. Продолжительность эксперимента составляла 8 суток. Установлено, что концентрации гиббереллиновой кислоты  $0,39 \times 10^{-8}$  и  $0,79 \times 10^{-8}$  моль/л оказывали стимулирующее воздействие на динамику роста клеток *I. galbana*, по сравнению с контрольной группой. Максимальный прирост клеток в культуре наблюдался при добавлении гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  моль/л и составлял 721%. Проведена оценка биохимических показателей культуры водорослей *I. galbana*, с добавлением гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  моль в течении 8 суток эксперимента в сравнении с контрольной группой. Показано увеличение, по сравнению с контрольной группой, количества белка, липидов, углеводов и хлорофилла в культуре водорослей, выращиваемых с добавлением гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  моль, на момент окончания эксперимента.

**Ключевые слова:** микроводоросли, культивирование, *Isochrysis galbana*, фитогормоны, гиббереллиновая кислота.

#### 1. Введение

*Isochrysis galbana* (*Haptophyta*) одна из наиболее используемых в аквакультуре морских микроводорослей. Большинство работ по оценке роста культуры микроводоросли связано с оценкой влияния солености, температуры и концентрации питательных веществ [4], [5], [13].

Рост *I. galbana* в миксотрофных условиях более быстрый, чем в фототрофных условиях, в гетеротрофных условиях отмечается подавление роста. При миксотрофии оптимальный фотопериод составляет около 12 ч.

Использование микроводоросли в аквакультуре основано на ряде ее свойств: способность к массовому культивированию, высокие темпы роста, оптимальный размер клеток для поглощения личинками моллюсков (1–15 мкм), высокая питательная ценность [3], [4].

Кормовое применения штаммов *Isochrysis* в первую очередь основано на разнообразных классах липидов. Содержание липидов модулируется различными факторами в том числе соленостью. Отмечено, что увеличение солености с 5 ‰ до 50 ‰ приводит к снижению содержания липидов в культуре *I. galbana* в 2 раза [22]. Однако при фототрофии вид успешно культивируется в широком диапазоне солености среды, а при миксотрофии оптимальное значение солености составляет 35‰ [1].

Питательная ценность микроводоросли значительно варьируется в зависимости от условий культивирования и зависит от биохимического состава микроводорослей.

Были предложены различные стратегии коррекции содержания белка и липидов в микроводорослях. Одним из таких подходов является использование стимуляторов роста (фитогормонов).

Гиббереллиновая кислота – дитерпеновый фитогормон, оказывающий влияние на метаболизм микроводорослей, усиливающий утилизацию питательных веществ из среды роста, способствующий накоплению каротиноидов, липидов, хлорофилла в различных видах микроводорослей [7], [19], в том числе *I. galbana* [21]. В то же время внесение в культуральную среду *Tetraselmis suecica* различных концентраций гиббереллиновой кислоты не оказывало влияния на концентрацию липидов при 14-дневном культивировании [14].

В настоящее время производство микроводорослей является дорогостоящим способом получения биомассы микроводорослей с переменным биохимическим составом [11], [17].

Вопрос эффективности влияния фитогормонов на биохимические и ростовые показатели в основном определяется концентрацией гормона и временем культивирования микроводоросли в среде его содержащей. Отмечается, что ряд показателей химического состава, после определенного времени культивирования в среде с включением фитогормона, после достижения оптимальных показателей снижается [21]. Знание рационального времени культивирования, концентраций фитогормонов и биохимического состава микроводорослей может служить основанием разработки способа их культивирования в качестве корма, при достижении оптимальных значений энергетической ценности биомассы.

Целью настоящего исследования являлось определение эффективной концентрации гиббереллиновой кислоты для обоснования рациональных параметров культивирования *I. galbana* с учетом биохимических показателей состава.

## 2. Методы

В работе использовали культуру микроводорослей *Isochrysis galbana* из коллекции НПДМ ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз». Водоросль выращивали в накопительном режиме на питательной среде f/2, которую готовят на основе фильтрованной и стерилизованной морской воды с добавлением растворов основных минеральных солей ( $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), микроэлементов ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; ЭДТА- $\text{Na}_2$ ;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) и витаминов ( $\text{B}_1$ ;  $\text{B}_7$ ;  $\text{B}_{12}$ ) [8]. Культура водорослей содержалась при постоянных условиях: температуре 21–23 °С, освещенности 8–10 кЛк, фотопериоде 8:16 ч (свет: темнота) и периодическом перемешивании (4–5 раза в сутки).

В качестве стимулятора роста использовали гиббереллиновую кислоту (Hebei Guanlang Biotechnology Co., Ltd, China).

В качестве культиваторов использовались стеклянные термостойкие конические колбы объемом 1 литр. В эксперименте использовали 4 стерильных колбы, в три из которых в начале эксперимента наливали 400 мл чистой фильтрованной и стерилизованной морской воды, 100 мл культуры водорослей и стимулятор в концентрациях –  $0,39 \times 10^{-8}$  М;  $0,79 \times 10^{-8}$  М;  $3,2 \times 10^{-8}$  М/л. Четвертая колба была контрольной, т.е. культура росла без добавления стимулятора роста.

Культивирование осуществляли в монокультуре. Прирост биомассы водорослей определяли по увеличению числа клеток, просчитанных в каждом опыте в трех камерах Горяева под световым микроскопом. Продолжительность эксперимента составляла 8 дней.

Общее содержание углеводов оценивали методом кислотного гидролиза проб взвези водорослей, за счет чего образовавшиеся моносахаридные единицы переходят в фурфурольные производные, которые при добавлении в раствор L-триптофана образуют окрашенные комплексы, поглощающие свет при длине волны 540 нм [15].

Пробоподготовку проб для определения белка проводили согласно [10]. Определение содержания белка проводили методом Лоури [16].

Общее содержание липидов проводили методом, в основе которого лежит цветная реакция ванилина в кислой среде с липидами, с образованием интенсивного окрашивания. Хромогенными группами выступают гидроксильные и карбонильные [12].

Сумму хлорофиллов выделяли методом экстракции ацетоном из предварительно замороженной биомассы водорослей [6]. Количественное содержание хлорофиллов определяли спектрофотометрически при длинах волн 630, 647, 664 и 750 нм. В качестве контроля использовали 90% ацетон [2].

## 3. Результаты

Гиббереллиновая кислота стимулировала рост культуры *I. galbana* в концентрациях  $0,39 \times 10^{-8}$ ,  $0,79 \times 10^{-8}$  М/л. Увеличение значения плотности культуры при использовании концентрации фитогормона  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л через 8 дней культивирования составило 822%, а для концентрации  $0,79 \times 10^{-8}$  М/л – 721%. При этом прирост в контрольной группе за тот же период составлял 674%. Концентрация фитогормона  $3,2 \times 10^{-8}$  М/л угнетала рост культуры *I. galbana*,

прирост в этой группе составлял 630% (рисунок 1). Следует отметить, что рост культуры *I. galbana* под действием гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л имел линейный характер в течение всего периода культивирования. Различие в плотности культуры микроводорослей при использовании гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л и в контрольной группе (без использования фитогормона) составляла 1.22 млн. кл/мл.

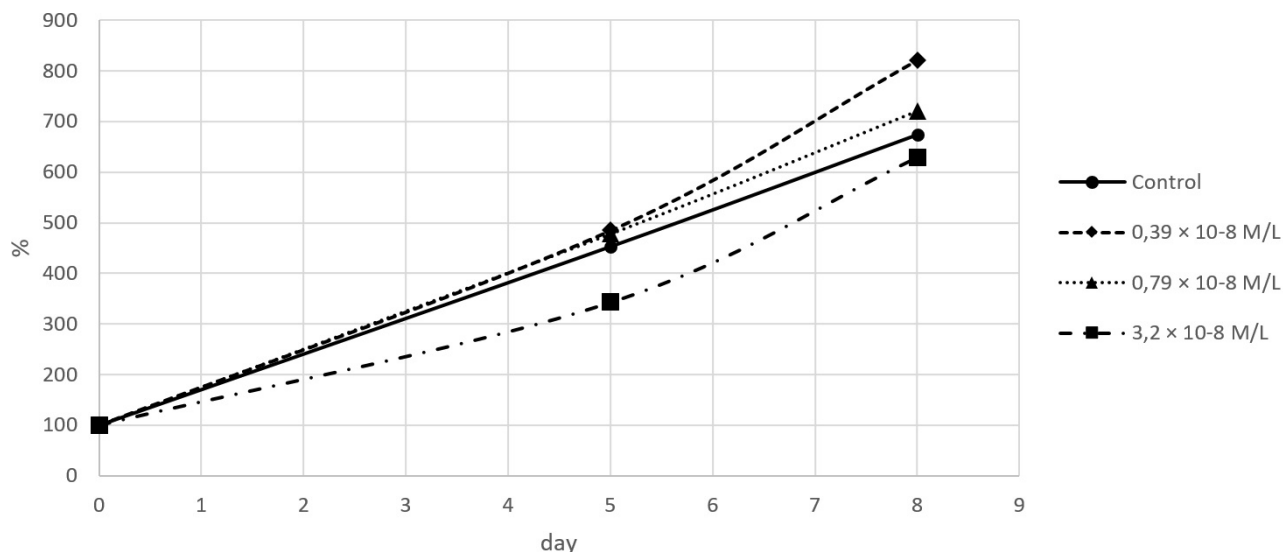


Рис. 1 – Динамика роста культуры *I. galbana* при различных концентрациях гиббереллиновой кислоты

На основании проведенного определения эффективной концентрации фитогормона анализ основного биохимического состава культуры *I. galbana* проведен для микроводорослей, культивированных на среде с содержанием гиббереллиновой кислоты  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л.

Проведенный анализ показал, что концентрация белка в контрольной группе за 8 суток культивирования увеличилась на 172% и составила 22,3 мкг/мл культуры (рисунок 2). Применение гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л способствовало увеличению содержания белка в культуре *I. galbana* на 213,4%, что составило 25,7 мкг белка в 1 мл культуры микроводорослей. Количественная разница по содержанию белка в контрольной культуре и культуре, выращенной с применением гиббереллиновой кислоты на 8 день культивирования, составила 15,2 % (рисунок 2).

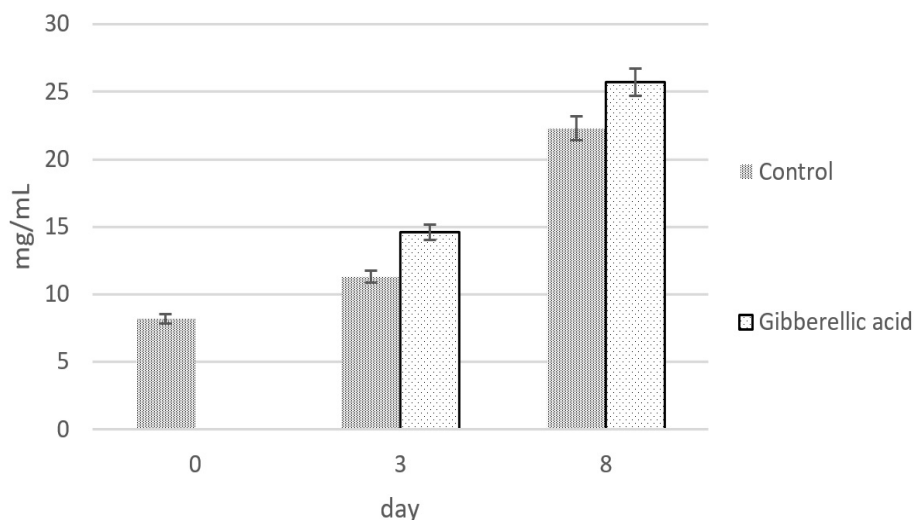


Рис. 2 – Динамика концентрации белка в культуре *I. galbana* под влиянием  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л гиббереллиновой кислоты

Анализ количественного содержания общих углеводов показал, что их количество практически не изменялось в контрольной культуре *I. galbana* в течение всего эксперимента и варьировало в пределах 18,1–21,3 мкг/мл (рисунок 3). В то же время внесение в среду культивирования гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л, в первые 3 суток выращивания, способствовало увеличению количества углеводов до 36,7 мкг/мл, т.е. на 108,2% по сравнению с началом эксперимента. Следует отметить, что дальнейшее культивирование *I. galbana* в среде с гиббереллиновой кислотой приводило к снижению концентрации общих углеводов на 25%. Однако на 8 сутки культивирования концентрация углеводов в экспериментальной группе была на 28% выше, чем в контрольной группе на тот же день культивирования (рисунок 2).

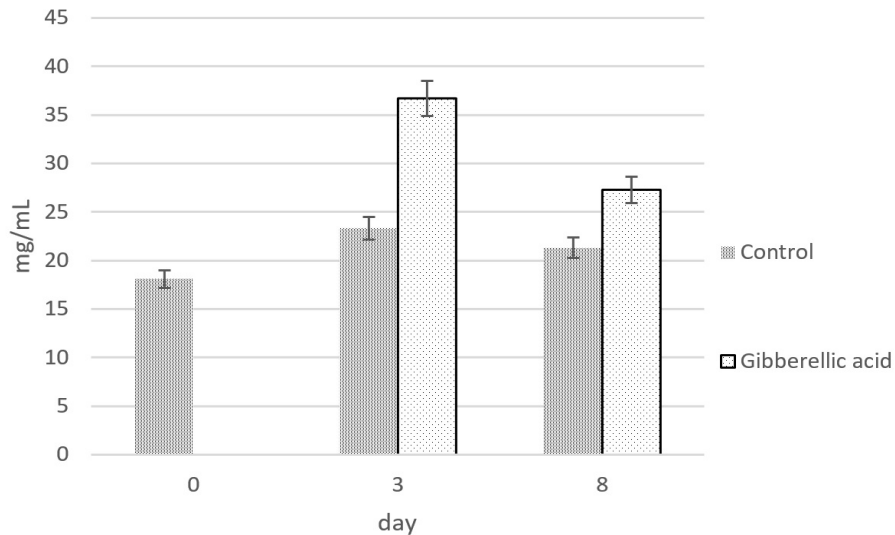


Рис. 3 – Динамика концентрации углеводов в культуре *I. galbana* под влиянием  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л гиббереллиновой кислоты

Динамика концентрации липидов в контрольной группе культуры *I. galbana* в первые 3 суток культивирования не изменялась (рисунок 4). Отмечено увеличение концентрации липидов в данной группе на 32% на 8 сутки культивирования.

Внесение в среду гиббереллиновой кислоты уже на 3 сутки культивирования приводило к резкому росту накопления липидов, на 76,5 % по сравнению с начальными значениями. Дальнейшее культивирование (8 суток) не значительно (до 81,5%) увеличивало концентрацию липидов в культуре. На 8 сутки культивирования различие в концентрации липидов экспериментальной и контрольной культур *I. galbana* составило 37,4% (рисунок 4).

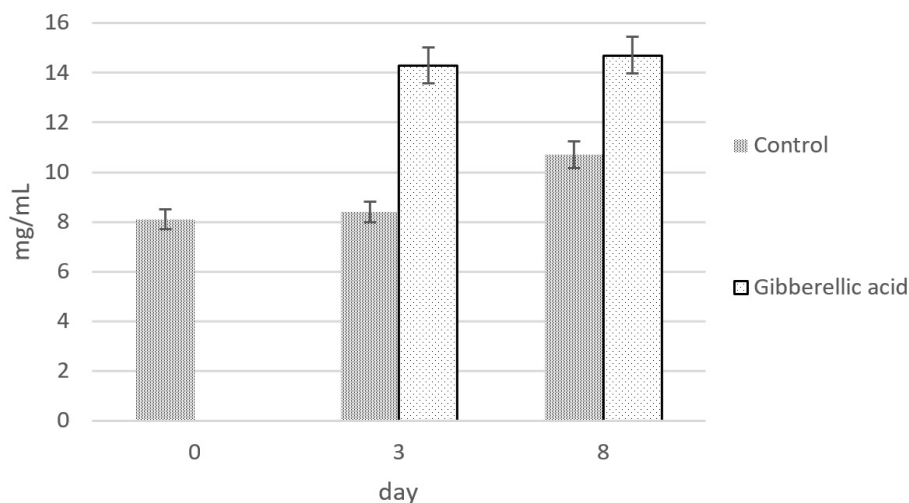


Рис. 4 – Динамика концентрации липидов в культуре *I. galbana* под влиянием  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л гиббереллиновой кислоты

Изменение биохимического состава микроводорослей связано с активностью фотосинтетического аппарата клетки и в первую очередь с количественным содержанием хлорофилла. Проведённым исследованием установлено, что количественное содержание хлорофилла в контрольной группе *I. galbana* увеличивалось на 460% на 8 сутки эксперимента (рис.5). Внесение в среду культивирования гиббереллиновой кислоты приводило практически к 6-кратному увеличению количественного содержания хлорофилла на 8 сутки выращивания *I. galbana* (рисунок 5).

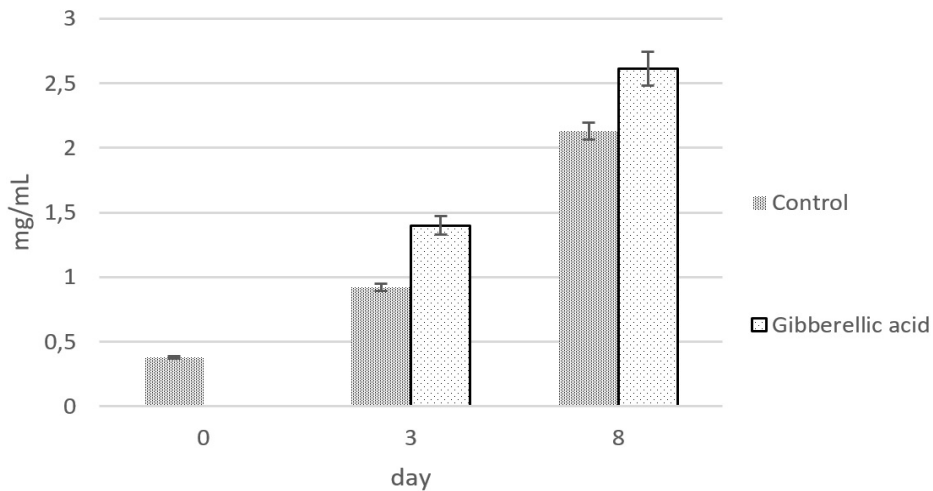


Рис. 5 – Динамика концентрации хлорофилла в культуре *I. galbana* под влиянием  $0,39 \times 10^{-8}$  М гиббереллиновой кислоты

Следует отметить также, что количественное соотношение различных групп пигментов в фотосинтетическом аппарате водорослей напрямую влияет на их фотосинтетическую активность, а, следовательно, и на продуктивность фотосинтеза и последующий рост биомассы (рис. 6).

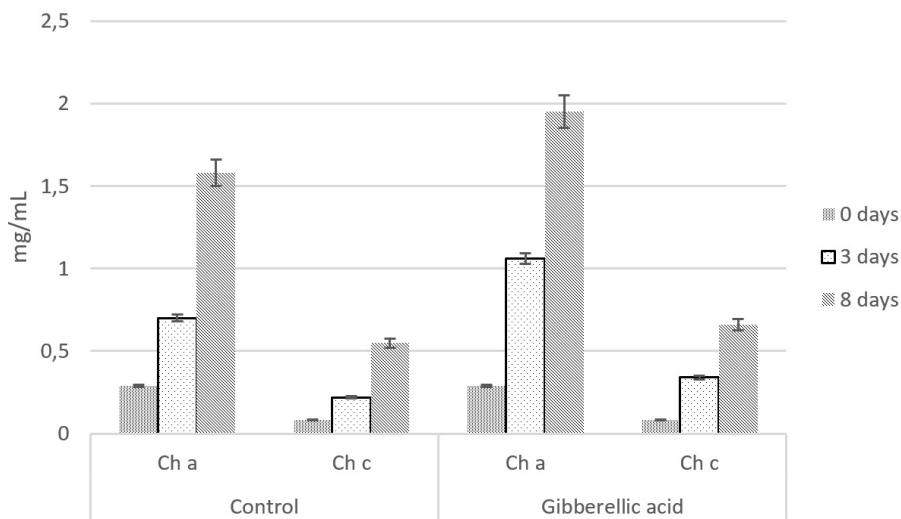


Рис. 6 – Динамика концентрации хлорофилла, а и хлорофилла с в культуре *I. galbana* под влиянием  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л гиббереллиновой кислоты

Проведенное исследование показало, что внесение в культуральную среду гиббереллиновой кислоты в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л достоверно увеличивало количество хлорофилла, а, и не оказывало влияния на концентрацию хлорофилла с (рис. 6). По-видимому, фотосинтетическая активность клеток микроводоросли при возрастании концентрации хлорофилла эффективна с точки зрения энергетического обеспечения синтетических процессов, что не требует вовлечения дополнительных антенн (хлорофилл с) поглощения квантов света.

#### 4. Обсуждение

Процесс роста и развития организмов, как правило, связывают с синтезом белка. Известно, что использование некоторых фитогормонов при культивировании микроводорослей способствует росту биомассы за счет активации ферментных систем синтеза аминокислот [20]. В то же время применение гиббереллиновой кислоты не оказывало влияния на синтез белка *C. sorokiniana* [24].

Проведенное ранее исследование Sadat с соавторами показало стимулирующий на 43,3% эффект синтеза белка при использовании гиббереллиновой кислоты в концентрации  $4 \text{ mg l}^{-1}$  при 14-дневном культивировании [21]. Полученные нами данные 8-дневного эксперимента свидетельствуют о стимуляции накопления белка на 15,3%. С учетом различия длительности эксперимента данные представляются сравнимыми.

Описанная выше динамика биохимического состава культуры *I. galbana* при использовании гиббереллиновой кислоты не совпадает с ранее проведенными Sadat с соавторами исследованиями [21]. Авторами постулируется снижение уровня углеводов в культуре микроводоросли при концентрации  $6 \text{ mg l}^{-1}$  по сравнению с контролем. Проведенное исследование показало, что максимальное содержание углеводов в культуре выявляется на 3 сутки. Несмотря на снижение концентрации углеводов на 8 сутки эксперимента, их концентрация остается выше, чем в контроле до окончания эксперимента, при использовании фитогормона в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л.

Аналогичным образом гиббереллиновая кислота в концентрации  $0,39 \times 10^{-8}$  М/л индуцировала накопление липидов в культуре *I. galbana* на 3 сутки культивирования до  $14,3 \text{ мкг. мл}^{-1}$  и их концентрация оставалась неизменной до окончания эксперимента. В то же время значимых различий в концентрации липидов контрольной группы в процессе культивирования не выявлено.

Для микроводорослей *Aurantiochytrium sp.* и *C. pyrenoidosa* описана обратная зависимость между содержанием углеводов и липидов в ответ на действие гиббереллиновой кислоты [7], [23]. Большинство концентраций гиббереллиновой кислоты показали также отрицательные результаты с точки зрения динамики сухого веса, содержания липидов и белка в культурах *Scenedesmus dimorphs* и 4 морфотипах *Chlorella* выделенных из разных регионов Египта [18].

Механизм такой корреляции определяется, по-видимому, использованием углеводов для синтеза липидов под действием ферментов, активируемых гиббереллиновой кислотой [9].

Несмотря на количественный рост культуры *I. galbana* под действием фитогормона энергетическая ценность сырой биомассы ( $4,91 \text{ кДж/100 г}$ ) была меньше, чем в контроле ( $5,97 \text{ 4,91 кДж/100 г}$ ).

## 5. Заключение

Проведенное исследование показало эффекты влияния на рост культуры *I. galbana* различных концентраций гиббереллиновой кислоты. Эффективная концентрация фитогормона –  $0,39 \times 10^{-8} \text{ М/л}^{-1}$  – повышала количество клеток в культуре на 148%, чем в контроле и составляла  $6,25 \text{ млн кл./мл}$  при культивировании в течение 8 суток. Выявлен рост концентрации белка и липидов в культуре *I. galbana* под влиянием гиббереллиновой кислоты в течение всего времени культивирования. Однако концентрация углеводов увеличивалась только к 3-м суткам культивирования и далее снижалась.

Заключая, следует отметить, что выявленные эффекты влияния гиббереллиновой кислоты позволяют разработать стратегию регуляции метаболизма культуры *I. galbana* для получения ее биомассы с оптимальным составом и питательной ценностью в качестве корма для аквакультурантов.

### Conflict of Interest

None declared.

### Конфликт интересов

Не указан.

### References

1. Румянцев Д.Е. Диагностика особенностей роста сосны и ели в Южной Карелии с использованием методов дендрохронологии. Автореф дис...канд. биол. наук. / Д. Е. Румянцев. – М.– МГУЛ – 22 с.
2. Fritts H.C. Tree rings and climate / H.C. Fritts. – London – New York – San Francisco – Academic press – 1976 – 576 p.
3. Соломина О.Н. Засухи Восточно-Европейской равнины по гидрометеорологическим и дендрохронологическим данным / О. Н. Соломина, И.С. Бушуева, Е.А. Долгова и др. – СПб. – Нестор-История. – 2017 – 360 с.
4. Чендев Ю.Г. Почвы и растительность юга Среднерусской возвышенности в условиях меняющегося климата / Ю. Г. Чендев, М.Г. Лебедева, С.М. Матвеев и др. – Белгород, Константа – 2016 – 326 с.
5. Cook E.A. A time series analysis approach to tree ring standartization. A dissertation Submitted to the Faculty of the School of renewable natural resources. / E.A. Cook – University of Arizona – 1985 – 171 p.
6. Matveev S.M. Climatic changes in the East-European forest-steppe and effects on Scots pine productivity / S. M. Matveev, Yu.G. Chendev, A. R. Lupo et al. // Pure and Applied Geophysics – 2017 – V. 174 – №1 – pp. 427–443
7. Матвеев С.М. Дендрохронология. / С. М. Матвеев – Воронеж – ВГЛТА – 2001 – 88 с.
8. Lovelius N.V. Dendroindication of natural processes and antropogenic influences / N.V. Lovelius – St-Peterburg, 1997 – 320 p.

### References in English

1. Rumyancev D.E. Diagnostika osobennostej rosta sosny i eli v Yuzhnoj Karelii s ispol'zovaniem metodov dendrohronologii [Diagnostics of pine and spruce growth features in South Karelia using dendrochronology methods]. Autoref. of dissertation of PhD in Biology / D. E. Rumyancev. – М.– МГУЛ – 22 p. [in Russian]
2. Fritts H.C. Tree rings and climate / H.C. Fritts. – London – New York – San Francisco – Academic press – 1976 – 576 p.
3. Solomina, O.N. Zasuhi Vostochno-Evropejskoj ravniny po gidrometeorologicheskim i dendrohronologicheskim dannym [Droughts of the East European Plain according to hydrometeorological and dendrochronological data] / O.N. Solomina, I.S. Bushueva, E.A. Dolgova – SPb. – Nestor-Istoriya. – 2017 – 360 p. [in Russian]
4. Chendev Yu.G. Pochvy i rastitel'nost' yuga Srednerusskoj vozvyshennosti v usloviyah menyayushchegosya klimata [Soils and vegetation of the south of the Central Russian Upland in a changing climate] / Yu.G. Chendev, M.G. Lebedeva, S.M. Matveev et al. – Belgorod, Konstanta – 2016 – 326 p. [in Russian].
5. Cook E.A. A time series analysis approach to tree ring standartization. A dissertation Submitted to the Faculty of the School of renewable natural resources. / E.A. Cook – University of Arizona – 1985 – 171 p.
6. Matveev S.M. Climatic changes in the East-European forest-steppe and effects on Scots pine productivity / S. M. Matveev, Yu.G. Chendev, A. R. Lupo et al. // Pure and Applied Geophysics – 2017 – V. 174 – №1 – pp. 427–443
7. Matveev S.M. Dendrohronologiya [Dendrochronology]. / S. M. Matveev – Voronezh – VGLTA – 2001 – 88 p. [in Russian].
8. Lovelius N.V. Dendroindication of natural processes and antropogenic influences / N.V. Lovelius – St-Peterburg, 1997 – 320 p.