

УДК 58.087

А.В. ЯРЕМИЧ, магістр екології, асистент кафедри екології,
Національний університет «Києво-Могилянська Академія»,
вул. Григорія Сковороди, 2, Київ, 04070, Україна
e-mail: stpmsuit@gmail.com
ORCID 0000-0002-6955-6977

В.І. КАРАМУШКА, к. б. н., доцент, зав. кафедри екології,
Національний університет «Києво-Могилянська Академія»,
вул. Григорія Сковороди, 2, Київ, 04070, Україна,
e-mail: vkarama2011@gmail.com, karamushka@ukma.edu.ua
ORCID 0000-0002-3327-2243

А.О. КРАМАРЕНКО, студент кафедри екології,
Національний університет «Києво-Могилянська Академія»,
вул. Григорія Сковороди, 2, Київ, 04070, Україна
e-mail: kramarenko.andriy@gmail.com, andrii.kramarenko@ukma.edu.ua
ORCID 0000-0002-3968-4388

ДИСТАНЦІЙНИЙ КОНТРОЛЬ ВИРОЩУВАННЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ В УМОВАХ РЕГУЛЮВАННЯ СЕРЕДОВИЩА КУЛЬТИВУВАННЯ

*При дослідженні умов культивування синьозеленої водорості *Spirulina platensis* та її реакцій на дію факторів стресу, зокрема іонів важких металів, було застосовано нову методику, яка дає можливість відслідковувати ріст біомаси мікрободоростей з матриці зразків і фіксувати показники зміни спектральних властивостей культури в автоматизованому дистанційному режимі спостереження. Кількість зразків, показники яких відслідковуються, може варіювати в широких межах, що суттєво розширює можливості тестування дії різних факторів. Показано переваги методики при дослідженні впливу іонів важких металів на культуру *Spirulina platensis*.*

Ключові слова: *Spirulina platensis*, культивування, фактори стресу, спектральні характеристики, дистанційний контроль.

Деякі види зелених водоростей і ціанобактерій зарекомендували себе як потенційні джерела сировини для виробництва харчових продуктів, паливних матеріалів, біологічно активних речовин, сорбентів тощо. Зокрема, використання біомаси таких ціанобактерій, як *Nostoc* та *Spirulina*, в якості харчових продуктів має тисячолітню історію [6, 15, 17]. Як кормо-

Ц и т у в а н н я: Яремич А.В., Карамушка В.І., Крамаренко А.О. Дистанційний контроль вирощування мікрободоростей в умовах регулювання середовища культивування. Гідробіол. журн. 2021. Т. 57, № 1. С. 50—58.

вий ресурс водорості також використовують в аквакультурних технологіях для вирощування риби, креветок [6].

Станом на сьогодні, як для експериментальних досліджень, так і для масштабного виробництва біомаси розроблено та використовується багато методів і технологій культивування мікрводоростей [17]. Дослідники і технологи використовують ефективні підходи і модифікації відомих методів, які найкраще пасують для досягнення конкретних цілей, зокрема для культивування водоростей в лабораторних умовах [3, 7], для масштабного виробництва біомаси у промислових реакторах [8, 12, 18], на відкритому повітрі [3, 14], при використанні нетрадиційних ресурсів для середовища вирощування тощо [5, 7].

Перспективи використання значного ресурсного потенціалу мікрводоростей є підставою для їхнього подальшого поглибленого дослідження. При цьому більшість сучасних методів культивування культур водоростей все ще передбачають рутинну ручну працю. Разом з тим, при виникненні необхідності підбору оптимального складу та концентрації компонентів середовища вирощування, тестування біологічно активних речовин, скринінгу факторів впливу на процес розвитку культури водоростей витрачається багато часу і наростає кількість помилок, які пов'язані з людським фактором.

Метою цього дослідження є розроблення методики паралельного культивування мікрводоростей у значній кількості (десятки) зразків з одночасним відслідковуванням показників наростання біомаси при контрольованих умовах середовища культивування. Досягнення зазначеної мети передбачало виконання кількох завдань, а саме: 1) визначення і оптимізація технологічних рішень одночасного культивування мікрводоростей в чисельних (десятки) зразках; 2) фіксація і накопичення статистичних даних щодо оптичних показників таких зразків та 3) застосування пропонованої методики для дослідження впливу іонів металів на розвиток мікрводоростей. В роботі описано схему застосування розробленої методики та представлено дані щодо її дієвості при дослідженні впливу деяких металів на розвиток культури *Spirulina platensis*.

Матеріал і методика досліджень

При дослідженні використовували культуру синьозеленої водорості *Spirulina platensis* Gomont (штам HPDP-60) з колекції відділу фікології, ліхенології і бріології Інституту ботаніки НАН України.

Водорість вирощували в пластикових стаканах об'ємом 200 см³, об'єм середовища культивування становив 150 см³. В якості останнього використовували середовище Заррука з незначними модифікаціями [19]. Для його приготування використовували реактиви кваліфікації «хімічно чистий» та «чистий для аналізу». Оскільки експерименти проводили протягом тривалого часу, випаровування води компенсували додаванням дистильованої води до початкового об'єму 150 см³. Візуальний контроль стану культури на різних стадіях вирощування здійснювали за допомогою світлового мікроскопу *Ulab XSP-137T LED*.



Рис. 1. Платформа для розміщення досліджуваних зразків

Зразки розміщували у світлоізолюваному боксі з власною системою освітлення і термостатування з постійною температурою у боксі 30 °С. Для освітлення використовували дві люмінесцентні лампи *Philips TL-D T8* з загальною потужністю 72 Вт.

Розроблена методика дала змогу відслідковувати показники декількох десятків зразків. Для перемішування середовища культури зразки розміщували на підвішеній платформі з вібродвигуном власної конструкції (рис. 1).

Спостереження за розвитком культури проводили за допомогою технології комп'ютерного зору [4], яка дає змогу виділяти кожну пробу матриці зразків та окремо фіксувати їхній стан. Для цього над зразками встановлювали моніторинговий комплекс власної розробки, який забезпечував задану періодичність фотофіксації. Основною функцією даного комплексу є реєстрація відносних показників поглинання світла культурою мікроводоростей. Для того, щоб отримати абсолютні показники концентрації біомаси у зразках, необхідно здійснити калібрування, тобто встановити відповідність показників сухої маси клітин оптичним показникам поглинання суспензії клітин при стандартизованих умовах і фіксованій довжині хвилі (або діапазоні хвиль). Оскільки мета експерименту полягала у відстеженні змін у культурі водоростей при різних факторах впливу, необхідність розрахунків абсолютних величин біомаси культури не була визначальною. У зв'язку з цим динаміку росту біомаси в кожному зразку характеризували, фіксуючи зміну відносного показника поглинання світла при обраних довжинах хвиль. Саме такий підхід до збору даних був обраний як оптимальний для експериментального моніторингу стану зразків вирощування мікроводоростей у матриці.

Показники поглинання світла реєстрували в трьох діапазонах — червоному (600—665 нм), зеленому (500—560 нм) і синьому (440—460 нм), що відповідає діапазонам чутливості вибраної цифрової камери (марка *SONY EXMOR IMX323*, Японія). Вказані канали є оптимальними для роботи з культурами фотоавтотрофних організмів, оскільки піки спектрів адсорбції хлорофілу реєструються в діапазонах довжин електромагнітних хвиль 430 нм та 660 нм. Реєстрацію поглинання при ~530 нм (зелений колір) використовували в якості відносного індикатора густини біомаси.

Середні і максимальні значення поглинання світла у вибраних світлових діапазонах фіксували як показники росту біомаси та накопичували в базі даних з автоматичною реєстрацією часу і номеру проби. Зафіксовані показники в автоматичному режимі передавали через мережу Інтернет в базу даних на віддалений сервер, де вони і зберігались. Процеси фіксації, реєстрації, накопичення, обробки і передавання даних в депозитарій на сервері здійснювали за допомогою мікрокомп'ютера та спеціально розробленого програмного забезпечення на мові програмування *Rython* з використанням бібліотеки комп'ютерного зору *OpenCV* [4]. Такий підхід дозволяв накопичувати та аналізувати значну кількість статистичних даних в автоматичному режимі.

Оскільки предмет моніторингу є набором простих об'єктів, які не змінюють свою форму і просторове розміщення під час проведення дослідів (стакани з середовищем вирощування), для визначення їхнього розташування використовували графічну маску, на якій розмічали зони фіксації оптичних показників кожного зразка (рис. 2).

Площу вказаних зон реєстрації показників спектральних характеристик обирали однаковою для всіх зразків, а їхнє розташування визначали таким чином, щоб зони покривали максимально можливу площу проби з урахуванням особливості форми ємності та радіальних спотворень зображення самою камерою. За допомогою розробленого алгоритму здійснювали по чергове обчислення показників зображення (величин поглинання світла) для кожної з визначених маскою зон на основному знімку.

Результати досліджень та їх обговорення

Застосування описаної вище методики при дослідженні динаміки розвитку культури *Spirulina platensis* показало, що вона дає змогу одночасно відслідковувати зміни, які відбуваються в зразках вирощування мікрводоростей. Криві поглинання світла в червоному, синьому і зеленому діапазонах, які опосередковано відображають інтенсивність розмноження клітин *Spirulina platensis*, показано на рисунку 3. Кожна представлена крива є середньою з серії, яка містила не менше трьох повторів.

Завдяки тому, що сигнали світлопоглинання реєстрували з моменту інокуляції середовища вирощування аліквотою матричної культури ціанобактерій, можна бачити, що до моменту, коли починається інтенсивне розмноження клітин, проходить певний час. Така затримка росту суттєво залежала від кількості клітин засівної дози матричної культури. При внесенні в середовище культивування 0,5 мл суспензії *S. platensis*, при кон-

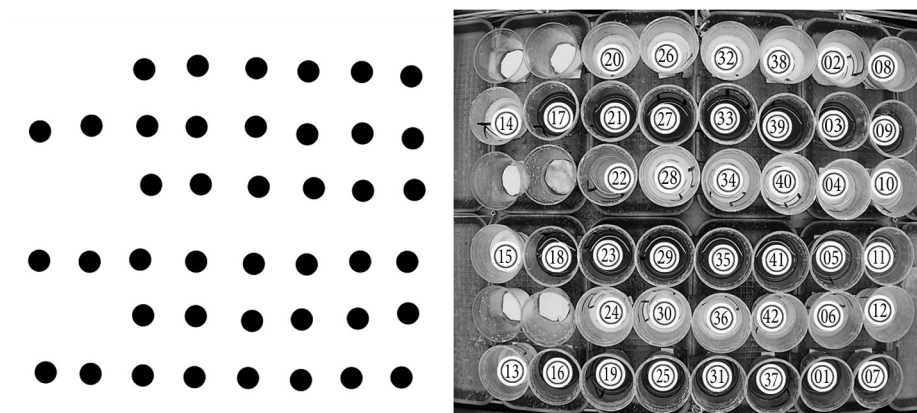


Рис. 2. Визначення та автонумерація проб з використанням маски: *a* — маска розташування проб в полі зору камери; *b* — автонумерація проб по масці

центрації приблизно 0,5 млн. кл/мл (стандартизована процедура), затримка до початку інтенсивного росту біомаси становила 4—8 діб, але після цього час розвитку культури до досягнення стаціонарного стану за оптичними показниками в червоному і синьому діапазонах спектру був помітно меншим — від 3 до 5 діб (рис. 3, *a*).

Крива поглинання світла в зеленому діапазоні демонструє більш уповільнену картину: вихід на насичення, яке спостерігається при 80 % від максимального, відбувається приблизно за 10 діб культивування (див. рис. 3, *a*, крива *g*). Різниця рівнів поглинання між трьома кривими є характерною для фотосинтезуючих організмів: світло в зеленому діапазоні не лише поглинається клітинами ціанобактерій, а й відбивається (на відміну від світла червоного і синього діапазонів), що і є причиною їхнього зеленого забарвлення.

Дані, представлені на рисунку 3 (*b*), свідчать про те, що показники, які реєструються, є досить чутливими до стану, в якому перебуває культура. При появі в середовищі вирощування факторів, які здатні впливати на функціональний стан ціанобактерій, спостерігається помітна зміна показників світлопоглинання досліджуваної культури. Внесення в середовище вирощування $BaCl_2$ до концентрації 0,1 мМ перед інокуляцією спричинювало ефект, схожий на стимулювання росту культури *S. platensis* (див. рис. 3, *b*): лаг-фаза помітно скорочувалась, а крива експоненціальної фази росту була більш крутою. Барій не є життєво необхідним елементом, і його вибір для експериментів був обумовлений тим, що у розчинній та нерозчинній формах його сполуки здатні пригнічувати ріст зелених одноклітинних водоростей при близьких концентраціях [14, 16]. Відсутність токсичного впливу барію по відношенню до культури *S. platensis* є неочікуваним і залишається предметом подальших досліджень. Виявлення непередбачуваних реакцій одноклітинних водоростей і ціано-

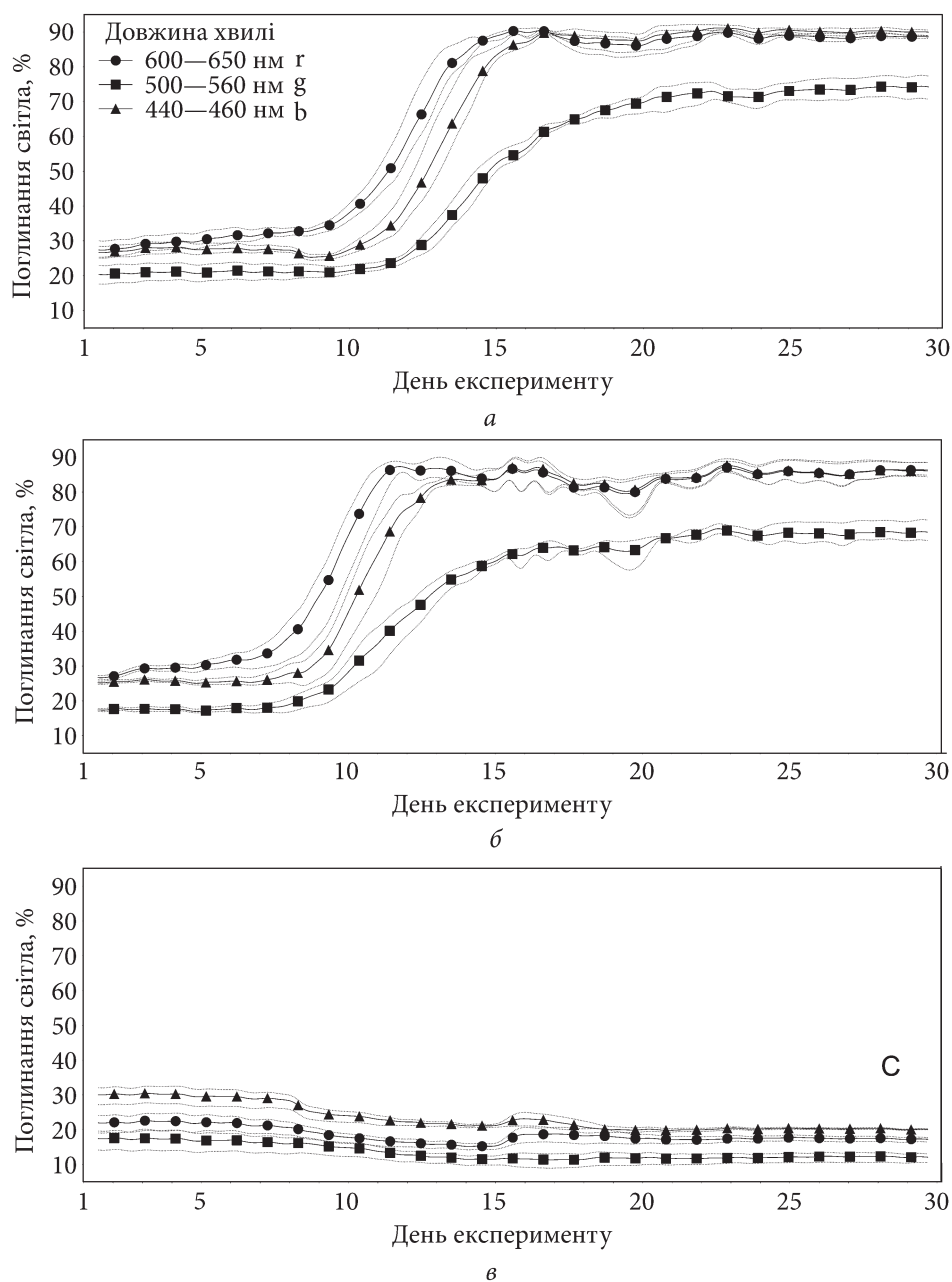


Рис. 3. Зміни адсорбції світла культурою *S. platensis* у різних спектральних діапазонах: *a* — контроль, середовище Заррука; *б* — середовище Заррука + 0,1 мМ BaCl₂; *в* — середовище Заррука + 0,1 мМ CuCl₂

бактерій у присутності іонів або високодисперсних часток металів є важливим моментом в отриманні та дослідженні штамів, стійких до підвищених концентрацій металів у водному середовищі. Показано, що певні штами *S. platensis* здатні вилучати з водного середовища метали, зокрема

такі як Cu і Au, витрачаючи при цьому енергію метаболічних процесів [1, 2]. Разом з тим, важкі метали на загал спричинюють виражений токсичний ефект на культури водоростей, і цей ефект посилюється при підвищенні концентрації іонів металів. В цьому відношенні показовими є впливи йонів міді [13, 16].

В наших експериментах іони міді, на відміну від барію, при концентрації 0,1 мМ в середовищі зростання повністю пригнічували розмноження клітин, про що свідчить повна відсутність зміни показників адсорбції світла (див. рис. 3, в). Використані в експериментах концентрації CuCl_2 відповідали тим, при яких спостерігався виражений інгібуючий ефект цього агента на функціональний стан мікроводоростей. Зокрема, при подібних концентраціях іони міді пригнічували культуру спіруліни також на стадії активного росту [13]. Кореляція ефектів впливу металів на культуру мікроводоростей, зафіксованих різними методами, підтверджує релевантність запропонованої нами методики.

Візуальний контроль культури за допомогою світлового мікроскопу підтвердив відсутність забруднення іншими видами мікроводоростей та не виявив видимих морфологічних відмінностей між клітинами ціанобактерії *S. platensis*, вирощених на контрольному і на модифікованому барієм середовищах. Клітини ціанобактерії через незначний час після внесення до середовища з 0,1 мМ CuCl_2 (0,5—1 год) поступово втрачали зелений колір і седиментували. В подальшому спостерігались порушення морфологічної цілісності клітин та їхня фрагментація.

Висновки

Запропонована методика дає змогу здійснювати дистанційний моніторинг росту біомаси мікроводоростей одночасно з десятків зразків і фіксувати статистичні дані щодо змін спектральних властивостей біомаси в автоматизованому режимі. Цей підхід дає змогу скоротити час проведення дослідів, пов'язаних з оцінкою показників розвитку культури, і розширює експериментальні можливості для пошуку оптимальних рецептур середовищ вирощування, стимуляторів росту, для оптимізації технологічних процесів і для інших цілей. Методика є зручним інструментом тестування та оцінки впливу хімічних агентів на процеси життєдіяльності клітин різноманітних штамів одноклітинних водоростей, зокрема при пошуку й тестуванні протекторів клітин водоростей від стресових факторів.

Наведені в роботі результати дослідів, отримані за допомогою розробленої методики, підтверджують очікуваний токсичний вплив іонів міді на культуру *S. platensis* і свідчать про можливий стимулюючий вплив іонів барію. Механізми стимулюючого ефекту барію, як і пошуки протекторів водоростей від токсичної дії іонів важких металів, залишаються предметом подальших досліджень.

Список використаної літератури

1. Карамушка В.И., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р. Аккумуляция золота(III) клетками цианобактерии *Spirulina platensis*. *Микробиология*. 1995. 64 (2). С. 192—196.
2. Карамушка В.И., Грузина Т.Г., Ульберг З.Р. Особенности биосорбции тяжелых металлов из смешанных растворов клетками *Spirulina platensis*. *Коллоидный журнал*. 1998. № 3. С. 327—330.
3. Abo El-Khair B. El-Sayed, Mostafa M. El-Sheekh. Outdoor cultivation of *Spirulina platensis* for mass production. *Not. Sci. Biol.* 2018. 10(1). P. 38—44.
4. Bradski G. The OpenCV library. *Dr. Dobb's Journal*. 2000. 25(11). P. 120—126. <http://www.drdoobs.com/open-source/the-opencv-library/184404319>.
5. Dineshkumar R., Narendram R., Sampathkumar P. Cultivation of *Spirulina platensis* in different selective media. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 2016. 45(12). P. 1749—1754.
6. Farrar W.V. Algae for food. *Nature*. 1996. 211. P. 341—342.
7. Fedekar Fadel Madkourb, Abd El-Wahab Kamila, Hoda Shafik Nasr. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 2012. 38. P. 51—57.
8. Florian Delrue, ID Emilie Alaux, Lagia Moudjaoui et al. Optimization of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) growth: From Laboratory Scale to Pilot Scale. *Fermentation*. 2017. 3 (59). P. 1—14.
9. Gildas Parfait Ndjouondo, Siegfried Didier Dibong, Fotsop Oscar Wamba, Victor D̄sir̄ Taffouo. Growth, productivity and some physico-chemical factors of *Spirulina platensis* cultivation as influenced by nutrients change. *Int. J. Bot.* 2017. 13 (2). P. 67—74.
10. Golding L., Adams M., Apte S. et al. Toxicity of dissolved barium to a freshwater alga (*Chlorella* sp. 12) and water flea (*Ceriodaphnia dubia*). SETAC-AU; 3—6 Sept. 2017; Gold Coast, QLD. CSIRO; 2017. 1. <http://hdl.handle.net/102.100.100/88020?index=1>.
11. Hudson C., Polonini H.C., Brandro H.M. et al. Size-dependent ecotoxicity of barium titanate particles: the case of *Chlorella vulgaris* green algae. *Ecotoxicology*. 2015. Vol. 24. P. 938—948.
12. Morais Michele, Silva Cleber, Adriano Arruda, Costa Jorge. Carbon dioxide mitigation by microalga in a vertical tubular reactor with recycling of the culture medium. *African Journal of Microbiology Research*. 2015. Vol. 9. P. 1935—1940.
13. Nalimova A.A., Popova V.V., Tsoglin L.N., Pronina N.A. The effects of copper and zinc on *Spirulina platensis* growth and heavy metal accumulation in its cells. *Russ J. Plant Physiol.* 2005. Vol. 52. P. 229—234.
14. Radmann E.M., Reinehr C.O., Costa J.A.V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*. 2007. Vol. 265. P. 118—126.
15. Saranraj P., Sivasakthi S. *Spirulina platensis* — food for future. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*. 2014. Vol. 4(1). P. 26—33.
16. Soad M. Mohy El-Din. Effect of copper and lead on growth and some metabolic activities of Cyanobacterium *Spirulina platensis* (Nordstedt). *Egypt. J. Bot.* 2017. Vol. 57(3). P. 445—456.
17. Usharani G., Saranraj P., Kanchana D. *Spirulina* cultivation: A Review. *Int. Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2012. Vol. 3(6). P. 1327—1341.
18. Yong Sang Kim, Sang-Hun Lee. Quantitative analysis of *Spirulina platensis* growth with CO₂ mixed aeration. *Environ. Eng. Res.* 2018. Vol. 23(2). P. 216—222.
19. Zarrouk C. Contribution a l etude d une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina platensis*. Ph.D thesis. Paris, 1996. 138 p.

Надійшла 09.06.2020

A. V. Yaremich, Master of Science in Ecology, Assistant of the Environmental Studies Department,
National University of Kyiv Mohyla Academy,
2 Skovoroda str., Kyiv, 04070, Ukraine
e-mail: stpmsuit@gmail.com
ORCID 0000-0002-6955-6977

V.I. Karamushka, PhD (Biol.), Assosiated Professor, Head of the Environmental Studies Department,
National University of Kyiv Mohyla Academy,
2 Skovoroda str., Kyiv, 04070, Ukraine
e-mail: vkarama2011@gmail.com, karamushka@ukma.edu.ua
ORCID 0000-0002-3868-1070

A.O. Kramarenko, Students of the Environmental Studies Department
National University of Kyiv Mohyla Academy,
2 Skovoroda str., Kyiv, 04070, Ukraine
e-mail: kramarenko.andriy@gmail.com, andrii.kramarenko@ukma.edu.ua
ORCID 0000-0002-3968-4388

REMOTE CONTROL OF MICROALGAE CULTIVATION UNDER CONDITIONS OF GROWTH MEDIUM REGULATION

The method of control over the cultivation process of blue-green alga *Spirulina platensis* and its reactions to stress factors is proposed in the work. The technique allows to monitor the development of biomass of microalgae from the matrix of samples and to record the changes in the spectral properties of the culture in the automated remote monitoring mode. The number of samples whose indicators are monitored can vary widely, which allows testing of various influencing factors. The advantages of the technique are demonstrated in the study of the influence of some factors (heavy metal ions) on the culture of *Spirulina platensis* under given conditions.

Keywords: *Spirulina platensis*, cultivation, stress factors, spectral characteristics, remote control.