

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). Algologia. 2016, 26(3):237–247

<http://dx.doi.org/10.15407/alg26.03.237>

УДК 582.261.1:573.7:574.6

РЯБУШКО В.И., ЖЕЛЕЗНОВА С.Н., ГЕВОРГИЗ Р.Г.,
БОБКО Н.И., ЛЕЛЕКОВ А.С.

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
пр. Нахимова, 2, 99001 Севастополь, Крым
rabushko2006@yandex.ru

СРЕДА ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN (BACILLARIOPHYTA)

Разработана новая питательная среда для интенсивного культивирования диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*. На основе химического анализа биомассы микроводоросли рассчитаны средние значения потребностей в азоте, фосфоре и кремнии для накопительной культуры. При лимитировании роста азотом наблюдается агглютинация клеток. Установлено, что высокие концентрации железа в питательной среде не оказывают ингибирующего действия на рост культуры *C. closterium*. В питательной среде азот может находиться в органической форме вследствие биосинтеза экзометаболитов. В стационарной фазе роста микроводоросли концентрация общего и органического азота в среде составляет 28 и 17,8 мг·л⁻¹. Потери азота в накопительной культуре достигают в среднем 10 %, максимальная сухая биомасса *C. closterium* составляет 4,6 г·л⁻¹, продуктивность — 1 г·л⁻¹·сут⁻¹. Использование новой питательной среды позволяет получать плотные культуры *C. closterium*, необходимые для наращивания ее биомассы с целью выделения биологически активных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты и каротиноиды, и прежде всего фукоксантин.

Ключевые слова: диатомовая водоросль *Cylindrotheca closterium*, питательная среда, биогенные элементы.

Введение

Диатомовые водоросли являются перспективным источником получения биологически активных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты, полисахариды, витамины, каротиноиды и др. (Takaichi, 2011). Среди многих видов *Bacillariophyta* особый интерес для исследователей представляет *Cylindrotheca closterium*, поскольку она обладает рядом уникальных свойств. В составе ее фотосинтетического аппарата содержание фукоксантина приблизительно равно 78 % общего количества каротиноидов (Peng et al., 2011), что составляет 1,7 % сухой биомассы.

© Рябушко В.И., Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г., Бобко Н.И., Лелеков А.С., 2016

Содержание жирных кислот в *C. closterium* достигает 40 %, из них полиненасыщенные жирные кислоты составляют 22 % общего количества жирных кислот (Dunstan et al., 1994). Эта водоросль способна накапливать йод и железо (de la Cuesta, Manley, 2009), активно растет и вегетирует при высоких концентрациях меди, марганца и других микроэлементов. В ее биомассе обнаружены такие стеролы, как холестерол (cholesta-5-en-3 β -ol) и дегидрохолестерол (cholesta-5,22-dien-3 β -ol) (Serrazanetti et al., 2006). Несмотря на уникальные особенности, *C. closterium* используется ограниченно как в лабораторных исследованиях (Bertrand, 2010), так и в промышленных масштабах (Lebeau, Robert, 2003; Kingston, 2009). Это связано в основном с отсутствием высокопродуктивных питательных сред и, как следствие, невозможностью работы с интенсивной культурой *C. closterium*.

Для культивирования *C. closterium* (Brouwer, Stal, 2002; Affan et al., 2009) традиционно используют питательные среды F или F/2 (Gullard, Ryther, 1962). Первая содержит недостаточное количество биогенных элементов, поэтому максимальная плотность культуры *C. closterium* достигает $(7,2 \pm 0,02) \cdot 10^4$ кл./мл (Affan et al., 2009). Практически отсутствуют сведения о потребностях *C. closterium* в азоте, фосфоре и других биогенных элементах. Поэтому использование питательной среды F не позволяет получать и исследовать плотные культуры *C. closterium*, что ограничивает ее использование в биотехнологии.

Цель данной работы – разработать новую питательную среду для диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, определить её потребности в азоте, фосфоре и кремнии, а также исследовать продукционные характеристики в накопительной культуре.

Материалы и методы

В работе использовали водоросль *Cylindrotheca closterium* из коллекции культур микроводорослей отдела экологической физиологии водорослей ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского (Севастополь). Культуру адаптировали к условиям эксперимента, выращивая на питательной среде 5F (Железнова, Геворгиз, 2014).

Выращивание осуществляли в режиме накопительного культивирования в фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочим объёмом 2 л, слоем 5 см, при круглосуточном освещении (средняя освещённость рабочей поверхности – 13,25 клк) и температуре 20 ± 1 °С. При этом культуру барботировали воздухом с помощью компрессорной установки. Эксперименты проводили при pH 8–9.

В качестве инокулята использовали активно делящуюся культуру микроводоросли. При определении потребностей *C. closterium* в биогенных элементах пробу центрифугировали для исключения попадания дополнительных биогенных элементов из инокулята в свежеприготовленную питательную среду. Начальная плотность культуры составляла 0,1–0,2 г сухого вещества на 1 л.

Сырую биомассу микроводоросли определяли весовым методом на аналитических весах (с погрешностью ± 1 мг) после осаждения клеток центрифугированием (3000 об/мин в течение 2 мин) проб в полипропиленовых пробирках. Сухую биомассу микроводоросли определяли после высушивания проб при температуре $105\text{ }^{\circ}\text{C}$. Соотношение между сухой и сырой биомассой микроводоросли 0,1.

В экспериментах использовали питательную среду 30F (Железнова, Геворгиз, 2014). Последовательно, лимитируя рост накопительной культуры концентрацией азота, фосфора и кремния в среде, определяли количество субстрата, необходимого для синтеза 1 г сухой биомассы микроводоросли.

Содержание азота и фосфора в биомассе *C. closterium* определяли стандартными методами после минерализации проб в муфельной печи при температуре $550\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Методы ..., 1988). Содержание общего железа устанавливали калориметрическим методом с применением сульфосалициловой кислоты (Шарло, 1965). Для определения концентрации кремния в биомассе использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии (Метод ..., 2003). Для этого 1 г навески минерализовали в муфельной печи при температуре $525\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ вместе с озоляющим средством – серой. Остаток оплавливали с флюсом ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$ и LiF в соотношении 9:1) при $925\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Затем в сплав добавляли 50 мл раствора винной кислоты (500 мл 1 %-ного раствора винной кислоты, подкисленного 40 мл концентрированной соляной кислоты и доведённого водой до 1 л). Концентрацию кремния определяли по абсорбции резонансного излучения элемента, используя калибровочную кривую. Измерения выполняли с точностью 250 ppm, со сходимостью $0,353 \times 10^{0,67}$ и воспроизводимостью $1,388 \times 10^{0,67}$.

Для определения концентрации кобальта, цинка, меди и марганца в *C. closterium* после минерализации биомассы в муфельной печи при $525\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и растворения зольного остатка в концентрированной азотной кислоте использовали метод атомно-абсорбционной спектрофотометрии с пламенной атомизацией.

Измерение биогенных элементов в сухой биомассе водорослей, а также самой биомассы проводили в 6–7 параллельных пробах. Для расчета доверительных интервалов использовали *t*-критерий Стьюдента для 95 %-й вероятности. В таблице и на рисунках приведены среднеквадратичные отклонения.

Результаты и обсуждение

Для получения плотных интенсивно растущих культур микроводорослей необходимо использовать высококонцентрированные питательные среды (Тренкеншу, Лелеков, 2005). Обычно для создания подобных сред применяют метод, предложенный в литературе (Ketchum, 1954; Tamiya, 1957; Кузнецов, Семененко, 1966). При этом,

чтобы получить сбалансированную по биогенным элементам питательную среду, следует учитывать стехиометрические соотношения химических элементов, входящих в состав культивируемого вида (Bumbak et al., 2011). В зависимости от стадии роста биохимический состав клеток может меняться, что приводит к изменению стехиометрических соотношений биогенных элементов, поэтому в культуре микроводорослей часто наблюдается избыточное потребление некоторых биогенных элементов (Левич и др., 1986; Тренкеншу, Лелеков, 2005; Тренкеншу, 2005). Для учёта потребления биогенных элементов широко используют понятие «потребности» или «экономического коэффициента», причем при избыточном потреблении биогенных элементов различают «истинную» и «наблюдаемую» потребность (Перт, 1978; Тренкеншу, 2005; Тренкеншу, Лелеков, 2005).

Понятие «потребности» для накопительной и проточной культур часто используется как синоним (Горбунова и др., 2011), однако величины «потребности» для накопительной и проточной культуры не эквивалентны. По сути, величины «истинной» и «наблюдаемой» потребности, как фундаментальные биологические характеристики исследуемого вида микроводорослей, могут быть получены только в проточной культуре, когда биохимический состав микроводорослей и условия культивирования остаются относительно неизменными во времени. В накопительной культуре в результате изменения физико-химических условий в культуре и биохимического состава клеток под величиной «потребности» следует понимать некоторую «среднюю потребность», которая во многом определяется количеством и продолжительностью фаз роста.

В данной работе рассчитаны средние значения потребностей в биогенных элементах для накопительной культуры *C. closterium*. При этом мы не рассматривали биогенные элементы (магний, сера, кальций и пр.), в избытке входящие в состав черноморской воды (Добровольский, Залогин, 1982), а также микроэлементы питательной среды F. Для выявления потребностей *C. closterium* в азоте, фосфоре и кремнии при накопительном культивировании предварительно был проведен химический анализ биомассы микроводоросли (табл. 1).

Таблица 1

Химический состав диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*

Макроэлемент	Содержание в биомассе, мг·г ⁻¹	Микроэлемент	Содержание в биомассе, мкг·г ⁻¹
Кремний	38,2±0,01	Кобальт	11±1
Азот	64±1	Марганец	75±3
Фосфор	16,6±1	Цинк	75±6
Железо	45±0,2	Медь	30±2

На основе химического анализа биомассы *C. closterium* рассчитывали «истинную» потребность в азоте, фосфоре и кремнии. Установлено, что для кремния и фосфора «истинная» и наблюдаемая потребности совпадают. Так, при начальной концентрации $0,386 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$, что в пересчете на кремний составляет $0,0382 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$, плотность культуры в стационарной фазе роста – $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$. Сходная тенденция наблюдается и при внесении $0,041 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (в пересчете на фосфор – $0,0166 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$).

Для азота «истинная» и наблюдаемая потребность не совпадают, поскольку для синтеза единицы массы микроводоросли характерно некоторое избыточное потребление азота. При начальной концентрации нитрата натрия $0,388 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ (в пересчете на азот $0,064 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$) максимальная плотность культуры достигает $0,88 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ (потери азота 12 %). Таким образом, средняя наблюдаемая потребность в азоте *C. closterium* составляет 7,2 %, а «истинная» – 6,4 %. Потери азота в накопительной культуре *C. closterium* в разных экспериментах не постоянны и составляют в среднем 10 %, как и у других видов микроводорослей (Левич и др., 1986).

В культуральной среде азот может находиться в органической форме вследствие биосинтеза экзометаболитов (Staats et al., 1999) или в неорганической форме в результате деятельности сопутствующей микрофлоры. По нашим данным, концентрация общего и органического азота в питательной среде составляет 28 и $17,8 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ соответственно, т.е. в стационарной фазе роста органический азот содержится в количестве 64 % общего азота, что характерно также при культивировании других видов микроводорослей (Левич и др., 1986). Азот в культуре *C. closterium*, в отличие от кремния и фосфора, является, по-видимому, невозвратным субстратом, или для его повторного вовлечения в биосинтез требуется много времени. Это следует из того, что при лимитировании роста азотом продолжительность стационарной фазы роста микроводоросли небольшая (на 6-е сут) (рис. 1) и наблюдалась агглютинация клеток. Максимальная биомасса *C. closterium* достигала $4,6 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$. Продуктивность культуры на участке 1 (первые 3 сут) была максимальной – $1 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$, на участке 2 (3–6 сут) – $0,45 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$.

Cylindrotheca closterium способна накапливать значительное количество железа, в отличие от азота, фосфора и других макроэлементов, поэтому для получения биомассы с минимальным содержанием этого элемента микроводоросль выращивали на питательной среде, в которой отсутствовал источник железа. В таких условиях биосинтез проходит только за счет внутриклеточных запасов железа, после истощения которых рост культуры прекращается. При уменьшении содержания железа в микроводоросли до $9 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$ культура приобретала оранжевый цвет и погибала (рис. 2). Эта концентрация не является величиной потребности, а только примерной оценкой, поскольку рассчитать потребность можно только методом проточных плотных культур, с учетом взаимодействия их с другими биогенными

элементами (Biswas, Bandyopadhyaya, 2013). При этом максимальная продуктивность *C. closterium* составляла $1,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

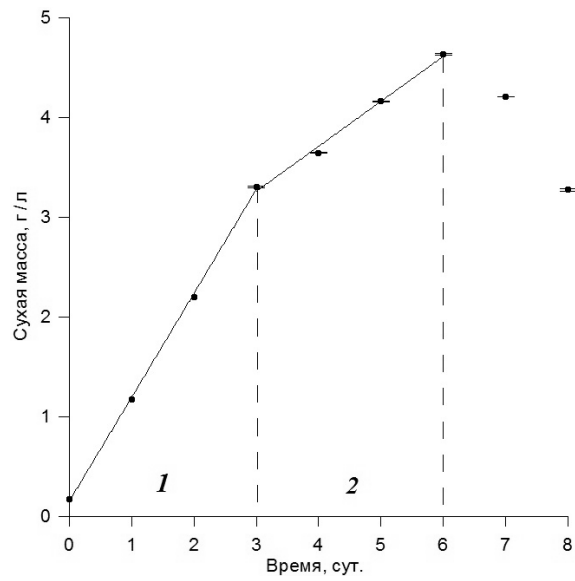


Рис. 1. Динамика биомассы диатомовой водоросли *Cylandrotheca closterium* на питательной среде RS

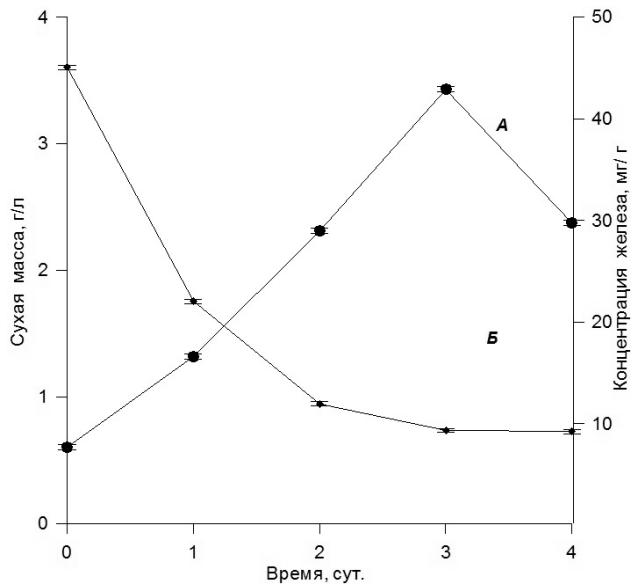


Рис. 2. Динамика биомассы диатомовой водоросли *Cylandrotheca closterium* (A) и концентрация железа в биомассе микроводоросли (B) при ее культивировании без источника железа в питательной среде

Установлено, что высокие концентрации железа в питательной среде (более 150 мг на литр среды) не оказывают ингибирующего действия на рост *C. closterium*. При высоких концентрациях железа в среде происходит его накопление в биомассе (до 45 г·кг⁻¹). Для того, чтобы избежать лимитирования роста микроводоросли, использовали питательные среды с концентрацией железа до 20 мг на 1 л среды (см. рис. 2).

Учитывая соотношение доли химических элементов в биомассе, была составлена питательная среда (RS), которую использовали для дальнейших экспериментов (табл. 2). Были рассчитаны потребности *C. closterium* для единицы биомассы с последовательным лимитированием роста плотности культуры биогенными элементами. При этом учитывали их начальную концентрацию в питательной среде и инокуляте, а также максимальную плотность накопительной культуры в стационарной фазе роста.

Таблица 2

Состав питательной среды RS для культивирования диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*

Компонент	Концентрация, г·л ⁻¹
NaNO ₃	0,388
NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	0,641
Na ₂ SiO ₃ × 9H ₂ O	0,386
Na ₂ EDTA	0,0872
FeSO ₄ × 7H ₂ O	0,1
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,0002
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,00044
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,0002
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,00036
NaMoO ₄ × H ₂ O	0,00012

Состав питательной среды RS рассчитан для получения 1 г сухой биомассы диатомовой водоросли *C. closterium*.

Выводы

Разработана новая питательная среда для получения плотной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*. Определены средние значения потребностей микроводоросли в азоте, фосфоре и кремнии. Максимальная продуктивность культуры *C. closterium* в первые трое суток эксперимента составляет 1 г·л⁻¹·сут⁻¹. Затем продуктивность снижается до 0,45 г·л⁻¹·сут⁻¹, когда сухая биомасса культуры достигает 4,6 г·л⁻¹. Применение новой питательной среды позволяет получать

плотные культуры *C. closterium*, необходимые для наращивания биомассы микроводоросли и выделения биологически активных веществ, таких как полиненасыщенные жирные кислоты и каротиноиды, и прежде всего фукоксантин.

Авторы выражают благодарность ведущему инженеру С.Г. Щепачеву за помощь в определении кремния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горбунова С.Ю., Боровков А.Б., Тренкеншу Р.П. Продуктивность культуры *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (*Cyanoprokaryota*) при различной обеспеченности минеральным фосфором // Альгология. – 2011. – 21(3). – С. 374–384.
- Добровольский А.Д., Залогин Б.С. Моря СССР. – М.: Изд-во МГУ, 1982. – 192 с.
- Железнова С.Н., Геворгиз Р.Г. Интенсивная культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // Вопр. соврем. альгол. – 2014. – 5(1). URL: <http://algology.ru/474>
- Кузнецов Е.Д., Семенов В.Е. Сбалансированные среды и перспективы их использования для стабилизации условий минерального питания одноклеточных водорослей при длительном интенсивном культивировании // Управляемый биосинтез. – М.: Наука, 1966. – С. 105–110.
- Левич А.П., Ревкова Н.В., Булгаков Н.Г. Процесс «потребление – рост» в культурах микроводорослей и потребности клеток в компонентах минерального питания // Экологический прогноз. – М.: Изд-во МГУ, 1986. – С. 132–139.
- Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов. – М.: ВНИРО, 1988. – 119 с.
- Метод IP 470/03. Определение алюминия, кремния, ванадия, никеля, железа, кальция, цинка и натрия в остаточных топливах озолением, сплавлением и атомно-абсорбционной спектрометрией: Сб. методик IP. – 2003. – С. 12.
- Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 261 с.
- Тренкеншу Р.П. Кинетика субстратзависимых реакций при различной организации метаболических систем. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2005. – 89 с.
- Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Простейшие модели роста микроводорослей 3. Потребность микроводорослей в элементах минерального питания // Экол. моря. – 2005. – Вып. 70. – С. 53–61.
- Шарло Г. Методы аналитической химии. Полный анализ неорганической химии / Пер. с франц. под ред. Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1965. – 350 с.
- Affan A., Neo S.-J., Jeon Y.-J., Lee J.-B. Optimal growth conditions and antioxidative activities of *Cylindrotheca closterium* // J. Phycol. – 2009. – 45. – P. 1405–1415.
- Bertrand M. Carotenoid biosynthesis in diatoms // Photosynth. Res. – 2010. – 106. – P. 89–102.
- Biswas H., Bandyopadhyaya D. Effects of iron availability on pigment signature and biogenic silica production in the coastal diatom *Chaetoceros gracilis* // Adv. Oceanogr. Limnol. – 2013. – 4(1). – P. 20–42.

- Brouwer J.F.C., Stal L.J. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (*Bacillariophyceae*) // J. Phycol. – 2002. – 38. – P. 464–472.
- Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., Kovar K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – 91. – P. 31–46.
- de la Cuesta J.L., Manley S.L. Iodine assimilation by marine diatoms and other phytoplankton in nitrate-replete conditions // Limnol. Oceanogr. – 2009. – 54. – P. 1653–1664.
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroil J.-M., Jeffrey S.W. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (*Bacillariophyceae*) // Phytochemistry. – 1994. – 35. – P. 155–161.
- Gullard R., Ryther J. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Husted and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran // Can. J. Microbiol. – 1962. – 8. – P. 229–239.
- Ketchum B.H. Mineral Nutrition of Phytoplankton // Ann. Rev. Plant. Physiol. – 1954. – 29. – P. 54–74.
- Kingston M.B. Growth and motility of the diatom *Cylindrotheca closterium*: implications for commercial applications // J. North. Carolina Acad. Sci. – 2009. – 125. – P. 138–142.
- Lebeau T., Robert J.-M. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: Cultivation at various scales // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – 60. – P. 612–623.
- Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health // Mar. Drugs. – 2011. – 9. – P. 1806–1828.
- Serrazanetti G.P., Folicaldi A., Guerrini F., Monti G., Pistocchi R., Boni L. Microalgal lipid markers for paleoclimatic research // Clim. Res. – 2006. – 31. – P. 145–150.
- Staats N., de Winder B., Stal L.J., Mur L.R. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipelagic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum* // Eur. J. Phycol. – 1999. – 34. – P. 161–169.
- Takaichi S. Carotenoids in algae: Distributions, biosynthesis and functions // Mar. Drugs. – 2011. – 9. – P. 1101–1108.
- Tamiya H. Mass culture algae // Ann. Rev. Plant. Physiol. – 1957. – 8. – P. 309–348.

Поступила 25 февраля 2016 г.

Подписала в печать Е.И. Шнюкова

REFERENCES

- Affan A., Heo S.-J., Jeon Y.-J., and Lee J.-B., *J. Phycol.*, 2009, 45: 1405–1415.
- Bertrand M., *Photosynth. Res.*, 2010, 106: 89–102.
- Biswas H. and Bandyopadhyaya D., *Adv. Oceanogr. Limnol.*, 2013, 4(1): 20–42.
- Brouwer J.F.C. and Stal L.J., *J. Phycol.*, 2002, 38: 464–472.

- Bumbak F., Cook S., Zachleder V., Hauser S., and Kovar K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91: 31–46.
- de la Cuesta J.L. and Manley S.L., *Limnol. Oceanogr.*, 2009, 54: 1653–1664.
- Dobrovolskiy A.D. and Zalogin B.S., *Morya SSSR* [Seas of the USSR], Moscow, Univ. Press, 1982, 192 p. (In Rus.)
- Dunstan G.A., Volkman J.K., Barrett S.M., Leroil J.-M., and Jeffrey S.W., *Phytochemistry*, 1994, 35: 155–161.
- Gorbunova S.Yu., Borovkov A.B., and Trenkenshu R.P., *Algologia*, 2011, 21(3): 374–384.
- Gullard R. and Ryther J., *Can. J. Microbiol.*, 1962, 8: 229–239.
- Ketchum B.H., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1954, 29: 54–74.
- Kingston M.B., *J. North. Carolina Acad. Sci.*, 2009, 125: 138–142.
- Kuznetsov E.D. and Semenenko V.E., *Upravlyaemy biosintez* [The operated biosynthesis], Nauka Press, Moscow, 1966, pp. 105–110. (In Rus.)
- Lebeau T. and Robert J.-M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 60: 612–623.
- Levich A.P., Revkova N.V., and Bulgakov N.G., *Ekologicheskiy prognoz* [Ecological forecast], Univ. Press, Moscow, 1986, pp. 132–139. (In Rus.)
- Metod IP 470/03, *Opređenje alyuminiya, kremniya, vanadiya, nikelya, zheleza, kaltsiya, tsinka i natriya v ostatochnykh toplivakh ozoleniem, splavleniem i atomno-absorbtsionnoy spektrometriy* [Definition of aluminum, silicon, vanadium, nickel, iron, calcium, zinc and sodium in residual fuels a combustion, alloyage and nuclear and absorbing spectrometry], Sb. metodik IP, 2003, 12 p.
- Metody gidrokhimicheskikh issledovaniy osnovnykh biogenykh elementov* [Methods of hydrochemical researches of the basic biogenous elements], VNIRO, Moscow, 1988, 119 p. (In Rus.)
- Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., and Wang J.-H., *Mar. Drugs.*, 2011, 9: 1806–1828.
- Pert S.Dzh., *Osnovy kultivirovaniya mikroorganizmov i kletok* [Bases of cultivation of microorganisms and cells], Mir Press, Moscow, 1978, 261 p. (In Rus.)
- Serrazanetti G.P., Folicaldi A., Guerrini F., Monti G., Pistocchi R., and Boni L., *Clim. Res.*, 2006, 31: 145–150.
- Sharlo G., *Metody analiticheskoy khimii. Polnyi analiz neorganicheskoy khimii* [Methods of analytical chemistry. Full analysis of inorganic chemistry], Khimiya Publ., Moscow, 1965, 350 p. (In Rus.)
- Staats N., de Winder B., Stal L.J., and Mur L.R., *Eur. J. Phycol.*, 1999, 34: 161–169.
- Takaichi S., *Mar. Drugs.*, 2011, 9: 1101–1108.
- Tamiya H., *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 1957, 8: 309–348.
- Trenkenshu R.P., *Kinetika substratzavisimykh reaktsiy pri razlichnoy organizatsii metabolicheskikh sistem* [Kinetics the substratzavisimykh of reactions at various organization of metabolic systems], EKOSI-Gidrofiz. Press, Sevastopol, 2005, 89 p. (In Rus.)
- Trenkenshu R.P. and Lelekov A.S., *Ekol. morya*, 2005, 70: 53–61.
- Zheleznova S.N. and Gevorgiz R.G., *Vopr. sovrem. algol.*, 2014, 5(1). URL: <http://algology.ru/474>

ISSN 0868-854 (Print)

ISSN 2413-5984 (Online). *Algologia*. 2016, 26(3):237–247

<http://dx.doi.org/10.15407/alg26.03.237>

Ryabushko V.I., Zheleznova S.N., Gevorgiz R.G., Bobko N.I., Lelekov A.S.

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of Southern Seas,
2, Nakhimov Pr., Sevastopol 99011, Crimea

THE MEDIUM FOR INTENSIVE CULTURE OF THE DIATOM *CYLINDROTHECA CLOSTERIUM* (EHRENB.) REIMANN ET LEWIN (*BACILLARIOPHYTA*)

The proposed medium was developed specially for intensive culture of the diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. The averages of nitrogen, phosphorus, and silicon demand for the culture were calculated using data from the chemical analysis of the microalgal biomass. Growth limitation by nitrogen provoked agglutination of the microalgal cells. High concentrations of iron did not inhibit growth of *C. closterium*. Organic nitrogen present in the medium can be due to biosynthesis of exometabolites. During the stationary growth phase, the total and organic nitrogen in the medium were evaluated 28 mg·L⁻¹ and 17.8 mg·L⁻¹, correspondingly. The average loss of nitrogen in the culture was estimated at 10%. The maximal dry biomass harvested from the diatom was 4.6 g·L⁻¹ and the productivity – 1 g·L⁻¹·d⁻¹. The new medium allows growing dense cultures of *C. closterium* with a larger biomass and therefore a proportionally larger yield of valuable biologically active substances, e.g., polyunsaturated fatty acids and carotenoids, primarily fucoxanthin.

Key words: diatom *Cylindrotheca closterium*, cultivation, nutritive medium, macro- and microelements.