

БИОДИЗЕЛЬ ИЗ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ: МЕТОДЫ ИНДУКЦИИ ЛИПИДОВ И СКРИНИНГА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ

Н.И. Чернова, С.В. Киселева, О.Ю. Калинина

МГУ им. М.В. Ломоносова, географический факультет, НИЛ ВИЭ
119991 Москва, Ленинские горы, д. 1
E-mail: chernova_nadegda@mail.ru

Заключение совета рецензентов: 15.11.15 Заключение совета экспертов: 18.11.15 Принято к публикации: 21.11.15

Работа посвящена изложению и анализу методических подходов к поиску новых нетрадиционных источников пищевого возобновляемого сырья для биотоплива третьего поколения на основе биомассы микроводорослей. Рассмотрена проблема и методы липидной индукции (увеличения содержания липидов) в микроводорослях (МКВ). Представлены результаты современных исследований в области получения перспективных штаммов МКВ – продуцентов липидов. В частности, обсуждается задача поиска стрессоров при двухстадийном культивировании, когда на первой стадии выращивание микроводорослей ведется в наиболее оптимальных условиях для получения максимального количества биомассы, а на второй стадии в результате создания условий физиологического стресса происходит биосинтез и аккумуляция в полученной биомассе липидов. Показаны и анализируются результаты собственных экспериментальных работ по выделению из природных источников новых кандидатных штаммов МКВ и подбору стрессоров для липидной индукции. Рассмотрена также целесообразность применения метода скрининга липидосодержащих микроводорослей окрашиванием флуоресцентным красителем Нильским красным, который был апробирован на широком спектре выделенных культур микроводорослей из разных таксонов. В качестве стрессоров для липидной индукции использовались голодание по азоту и фосфору, повышенная и пониженная освещенность, температурный режим. Показано значимое увеличение содержания липидов в клетках МКВ под действием стрессоров. Подтверждается перспективность использования технологичной быстрорастущей микроводоросли *Arthrospira platensis* в качестве модельного объекта для поиска стрессоров и – в целом – режима культивирования липидосодержащих микроводорослей. Выделенные культуры из природных источников подробно описаны и включены в коллекцию микроводорослей энергетического назначения НИЛ ВИЭ географического факультета МГУ.

Ключевые слова: микроводоросли, биотопливо, биодизель, липиды, триацилглицериды, флуоресцентный краситель Нильский красный, открытые и закрытые фотобиореакторы.

BIODIESEL FROM MICROALGAE: METHODS INDUCTION OF LIPIDS AND SCREENING PROMISING STRAINS

N.I. Chernova, S.V. Kiseleva, O.Yu. Kalinina

Lomonosov Moscow State University, Geographical Faculty, Renewable Energy Sources Laboratory
1 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia
E-mail: chernova_nadegda@mail.ru

Referred: 15.11.15 Expertise: 18.11.15 Accepted: 21.11.15

The work is devoted to the presentation and analysis of methodological approaches to finding new and innovative sources of renewable non-food raw materials for biofuels of third generation based on biomass of microalgae. The problem and methods of inducing lipid (lipid increase) in microalgae (MAL) were reviewed. The results of current researches in the field of obtaining promising strains MAL (producers of lipids) were demonstrated. In particular, we have discussed the task of finding a stressors for the two-stage culturing of microalgae, when the first stage of the cultivation of microalgae is conducted in the most optimal conditions for the maximum amount of biomass, and in a second step the biosynthesis and accumulation of lipid in the resulting biomass occurs as a result of creating the conditions of physiological stress. The results of the own experimental work on the

isolation from natural sources of new candidate strains and on the selection of stressors for lipid induction have been showing and analyzed. We also considered the feasibility of the method of screening lipid microalgae by means fluorescent dye Nile red, which has been tested on a wide range of isolated cultures of microalgae from different taxa. As stressors for inducing lipid the nitrogen and phosphorus starvation, high and low irradiation, temperature regimes have been used. Significant increases of lipid content in the cells under the influence of stressors microalgae have been shown. The prospect of using the technological fast growing microalga *Arthrospira platensis* as a model to find the stressors has been confirmed. Dedicated crops from natural sources are described in detail and included in the collection of microalgae for energy purposes Laboratory of RES geographical faculty of Lomonosov Moscow State University.

Keywords: microalgae, biofuel, biodiesel, lipids, triacylglycerides, fluorescent dye Nile red, open and closed photobioreactors.



Надежда Ивановна
Чернова
Nadezhda I. Chernova

Сведения об авторе: канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ВИЭ географического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Образование: факультет почвоведения МГУ (1974).

Область научных интересов: возобновляемые источники энергии, биоэнергетика, водородная энергетика, скрининг микроводорослей и цианобактерий, оценка ресурсов ВИЭ, лабораторное моделирование динамических процессов в океане.

Публикации: более 120, в том числе патенты на изобретения.

Information about the author: Dr. Sc. (biology/botany), senior scientific worker of Renewable Energy Sources Laboratory (Lomonosov Moscow State University, Faculty of Geography)

Education: Faculty of Soil Science Lomonosov Moscow State University (1974).

Research area: renewable energy sources, fuel from algae, screening of cyanobacteria and microalgae for industrial cultivation.

Publications: more than 120, including patents.



Софья Валентиновна
Киселева
Sophia V. Kiseleva

Сведения об авторе: канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ВИЭ географического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Образование: физический факультет МГУ (1987).

Область научных интересов: возобновляемые источники энергии, оценка ресурсов ВИЭ, лабораторное моделирование динамических процессов в океане.

Публикации: более 150, в том числе патенты на изобретения.

Information about the author: Dr. Sc. (physical-mathematical), senior scientific worker of Renewable Energy Sources Laboratory (Lomonosov Moscow State University, Faculty of Geography)

Education: Faculty of Physics Lomonosov Moscow State University (1987).

Research area: renewable energy sources: resource evaluation, ecology-geographical aspects of renewable energy; laboratory modeling of ocean and atmosphere's dynamical process.

Publications: more than 150, including patents.



Ольга Юрьевна
Калинина
Olga Yu. Kalinina

Сведения об авторе: младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории ВИЭ географического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Образование: Курганский гос. педагогический институт (1992).

Область научных интересов: биоразнообразие и выделение из природных источников новых штаммов микроводорослей как сырья для биотоплива.

Публикации: более 10.

Information about the author: junior scientific worker of Renewable Energy Sources Laboratory (Lomonosov Moscow State University, Faculty of Geography)

Education: Kurgan State Pedagogical Institute (1992).

Research area: isolation from natural sources of new strains of microalgae as a feedstock for biofuels.

Publications: more than 10.

Введение

Среди возобновляемых источников энергии биомасса всегда находила наиболее широкое применение. В последние десятилетия наблюдается значительный и устойчивый рост масштабов применения биомассы в энергетике, расширение спектра способов ее преобразования. Поэтому актуальной задачей стал поиск новых видов биомассы, новых технологий ее переработки и – особенно – технологий комплексного использования. Из интересных и перспективных направлений назовем биотехнологии энергетического применения микроводорослей. Получение биомассы МКВ с характеристиками, определяющими возможность и целесообразность ее использования в качестве сырья для различных отраслей промышленности, – важная задача современных исследований.

Определяющим фактором использования водорослей в энергетических целях является высокое содержание в них нейтральных липидов, в основном триацилглицеридов (ТАГ), и возможность управлять накоплением их путем изменения условий культивирования. Кроме того, по своей естественной биопродуктивности и энергосодержанию микроводоросли в десятки раз превышают традиционно используемые для этих целей сельскохозяйственные растения. Общее содержание липидов в микроводорослях обычно варьируется от 1 до 85% сухого веса [1]. Традиционно с микроводорослями связывают получение биодизельного топлива переэтерификацией из содержащихся в них липидов.

Для России рентабельным энергетическим продуктом из микроводорослей могут стать биодобавки к бензину, которые позволят получить моторное топливо, соответствующее требованиям стандартов Евро 4, 5 и выше. Согласно некоторым оценкам, потребление бензина в России в 2016 г. может достигнуть 38 млн т/год, при этом дефицит его составит 6 млн т [2].

Выбор стрессоров при двухстадийном культивировании микроводорослей

Поиски эффективных стрессоров, обеспечивающих индукцию липидов, являются одним из наиболее значимых направлений современных исследований микроводорослей как перспективного сырья для получения биодизеля. Исследования проводятся применительно к МКВ, принадлежащим различным таксонам. При этом в качестве наиболее широко исследуемых методов создания физиологического стресса можно выделить:

- голодание или лимитирование по биогенным элементам в составе питательных сред;
- повышенные или пониженные температуры выращивания;
- повышенная или пониженная соленость и pH питательных сред;
- тяжелые элементы и иные токсичные вещества в составе питательных сред;
- повышенная или пониженная интенсивность освещенности;
- ультрафиолетовое облучение культур микроводорослей.

Анализ ряда публикаций [3-6], а также обзорных работ [7-9] позволил систематизировать виды стрессоров, действие которых были апробированы на широком ряде микроводорослей. В табл. 1 представлен перечень стрессоров, приводящих к увеличению общих и/или нейтральных липидов и ТАГов, а также благоприятным образом (для получения биодизеля) изменяющих состав жирных кислот в биомассе МКВ. Так, видно, что в качестве биогенного элемента – стрессора наиболее эффективным для зеленых водорослей является азот или фосфор, а для диатомовых – кремний. Результативными стрессорами являются также пониженные температуры выращивания и/или значительно увеличенная/уменьшенная интенсивность освещения культур.

Таблица 1

Виды стрессоров, приводящих к индукции липидов в микроводорослях

Table 1

Types of stressors that lead to the induction of lipids in microalgae

Вид микроводорослей	Вид стресса (стрессора)			
	Голодание по биогенным элементам	Температура, °C	Соленость, г NaCl/л и pH	Освещенность и UV-облучение
<i>Botryococcus braunii</i>		Повышенная до 32		
<i>Chaetoceros muelleri</i>				UV-A
<i>Chaetoceros sp.</i>	P-	25		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	N-, S-			
<i>Chlamydomonas sp.</i>			Низкие значения pH	

Продолжение табл. 1

Вид микроводорослей	Вид стресса (стрессора)			
	Голодание по биогенным элементам	Температура, °C	Соленость, г NaCl/л и pH	Освещенность и UV-облучение
<i>Chlorella ellipsoidea</i>		Пониженная		
<i>Chlorella kessleri</i>	P-			
<i>Chlorella sp.</i>	N-, P-, Fe-		Щелочная pH	
<i>Chlorella vulgaris</i>	N-	Повышенная до 30	Fe3+ в питательной среде	
<i>Coelastrella sp.</i>	N-, P-			
<i>Cryptomonas sp.</i>		27-30		
<i>Crythecodinium cohnii</i> ATCC 30556			При концентрации 9	
<i>Cyclotella cryptica</i>	Si-			
<i>Dunaliella salina</i>		Снижение от 30 до 12	Увеличение солености от 29 до 205	
<i>Dunaliella sp.</i>			Увеличение солености от 23 до 234	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	N-		Увеличение солености от 29 до 58	
<i>Euglenia gracilis</i>			Кадмий, медь, цинк (в питательной среде)	
<i>Isochrysis galbana</i>	P-	Увеличение от 15 до 30		Более короткие световые периоды
<i>Isochrysis sp.</i>		27-30		
<i>Monodus subterraneus</i>	P-			
<i>Nannochloropsis oculata</i>	N-	Увеличение от 20 до 25		UV-A
<i>Nannochloropsis salina</i>		Повышенная		UV-A
<i>Neochloris oleoabundans</i>	N-			
<i>Nitzschia laevis</i>			Увеличение солености от 10 до 20	
<i>Ochromonas danica</i>		Увеличение от 15 до 30		
<i>Pavlova lutheri</i>		15		Интенсивное облучение
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	P-	Снижение от 25 до 10		UV-A
<i>Prorocentrum minimum</i>				Выращивание в темноте
<i>Rhodomonas sp.</i>		27-30		
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	N-			
<i>Scenedesmus sp.</i>	N-, P-			
<i>Schizochytrium limacinum</i>		В диапазоне 16-30	Увеличение солености от 9 до 36	
<i>Selenastrum capricornutum</i>		Снижение от 25 до 10 на 12 часов		Выращивание в темноте
<i>Spirulina platensis</i>	N-, P-	Повышенная до 30-40		
<i>Tetraselmis sp.</i>				UV-B
<i>Thalassiosira pseudonana</i>				Освещение 100 мкЕ/м ² /с, день: ночь = 24:0 в стационарной фазе
<i>Tichocarpus crinitus</i>				Низкая интенсивность облучения



Результаты проведенного анализа – наряду с собственными экспериментальными исследованиями – дали возможность осуществить эффективный поиск стрессоров для вновь выделенных штаммов.

Материалы и методы исследования

В нашей предыдущей статье в журнале «Альтернативная энергетика и экология» [10] мы рассматривали воздействие некоторых стрессоров на накопление нейтральных липидов в сине-зеленых водорослях (цианобактериях) на примере трех клоновых культур *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitl. Значительный опыт работы с этими водорослями, относительно простые и дешевые технологии их выращивания и сбора биомассы позволили нам использовать их как модельный объект при отработке методов скрининга липидосодержащих микроводорослей, а также определении оптимальных условий накопления липидов в биомассе. Общепринятым в настоящее время способом индукции липидов в МКВ является двухстадийный метод культивирования, когда выращивание проводится в две стадии: 1 стадия – выращивание в оптимальных (или близких к таковым) условиях для достижения максимальной продуктивности по биомассе; 2 стадия – перевод выращенной биомассы в условия физиологического стресса, который может достигаться различными способами. По указанной схеме нами на модельном объекте *A. platensis* на трех клоновых культурах проводился поиск оптимальных и стрессовых условий. Наиболее оптимальные условия культивирования на первой стадии подбирались для каждого из указанных штаммов. В результате для штамма *A. platensis*

um. rsemsu 1/02-II были наиболее эффективны открытые культиваторы, в то время как для штамма *A. platensis um. rsemsu 1/02-T* – закрытые фотобиореакторы [11, 12]. Выращивание проводилось на среде Заррук'а [13]. На второй стадии штаммы помещались в открытые культиваторы; при этом для индукции липидов подбирались стрессоры, приводящие к максимальному биосинтезу ТАГов. Для штаммов *A. platensis* экспериментально изучалось воздействие следующих стрессоров:

– повышенной и пониженной инсоляции (от $(2-4) \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{с})$ до $(450 \pm 25) \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{с})$); субоптимальных температур (от $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ до $(9 \pm 1)^\circ\text{C}$);

– лимитирования азота и фосфора в питательных средах;

– барботаж воздуха, содержащим 2% CO_2 (об.).

Эти стрессоры являются общепринятыми в соответствии с теоретическими основами накопления/запасания липидов клетками МКВ. Однако для каждого кандидатного штамма требовался более тонкий экспериментальный подбор специфических условий физиологического стресса, в результате были подобраны наиболее эффективные стрессоры (табл. 2, № 1-4). Для оперативного контроля действенности стрессоров на этом объекте была апробирована методика скрининга липидосодержащих микроводорослей, основанная на окрашивании их флуоресцентным красителем Нильским красным. Он может служить для витальной (прижизненной) окраски, которая позволяет относительно быстро выявлять содержащиеся в клетках ТАГи. Было показано, что данную методику можно использовать и для определения оптимальных условий накопления нейтральных липидов в разных штаммах *A. platensis* [10].

Таблица 2

Содержание липидов в биомассе микроводорослей, выращенных под воздействием различных видов стресса (вид стресса выделен жирным шрифтом)

Table 2

The lipid content in the biomass of microalgae grown under the influence of different types of stress (the kind of stress in bold)

№	Род/вид/штамм МКВ	Питательная среда, биогенные элементы, тип культиватора	Освещенность, $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{с})$	Концентрация CO_2 в газовой смеси, %	Время воздействия стрессоров, сутки	Содержание нейтральных липидов в оптимальных/стрессовых условиях, %
1	<i>Arthrospira platensis um. rsemsu 1/02-II</i>	Среда Заррука без азота и фосфора . Плоскостные открытые культиваторы (ПОК) объемом 20 л	250±5	2	14	19/30,9
2	<i>Arthrospira platensis um. rsemsu 1/02-II</i>	Среда Заррука без азота и фосфора , ПОК 20 л	160±5	2	15	19,0/26,1
3	<i>Arthrospira platensis um. rsemsu 1/02-II</i>	Среда Заррука без азота и фосфора , ПОК 20 л	215±5	2	15	19,0/32,0
4	<i>Arthrospira platensis um. rsemsu 1/02-T</i>	Среда Заррука без азота и фосфора , ПОК 1 л	400±25		2	36,1/47,1
5	<i>Elliptochloris subsphaerica um. rsemsu N-1/11-B</i>	Среда BG-11 без азота и фосфора , ПОК 1 л	450±50		2	25,0/23,5

Продолжение табл. 2

№	Род/вид/штамм МКВ	Питательная среда, биогенные элементы, тип культиватора	Освещенность, $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{c})$	Концентрация CO_2 в газовой смеси, %	Время воздействия стрессоров, сутки	Содержание нейтральных липидов в оптимальных/стрессовых условиях, %
6	<i>Chlamydomodium starrii</i> um. rsemsu Chcc-14/11	Среда BG-11 без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		2	43,2/34,0
7	<i>Chlorella vulgaris</i> um. rsemsu Chv-20/11	Среда Тамия без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		2	21,0/33,0
8	<i>Chlorella sp.</i> um. rsemsu Chl-1/11-B	Среда BG-11 без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		2	31,1/22,5
9	<i>Chlamydomonas sp.</i> um. rsemsu Chlam-10/11	Среда BG-11 без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		2	26,2/31,9
10	<i>Chlamydomonas globosa</i> um. rsemsu Chlam-15/11	Среда BG-11 без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		2	58,1/68,1
11	<i>Haematococcus pluvialis</i> um. rsemsu Hp-1/11	Среда ОНМ без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		1	4,0/16,8
12	<i>Stigeoclonium sp.</i> um. rsemsu St-m-13/11	Среда BG-11 без азота и фосфора, ПОК 1 л	450±50		2	22,0/25,7

Результаты экспериментального исследования подобранных стрессоров для модельного объекта *A. platensis* позволили применить их к другим, выделенным нами штаммам МКВ, а также к культурам, имеющимся в коллекции НИЛ ВИЭ. В российских коллекциях микроорганизмов практически не представлены штаммы, перспективные для производства жидких биотоплив. Поэтому основную задачу на современном этапе авторы видят в расширении поиска в природе микроводорослей – потенциальных продуцентов липидов, адаптированных к природным условиям России, в том числе толерантных к низким температурам выращивания. С этой целью в течение 2009-2014 гг. нами были проведены экспедиции в различные регионы России (озера Карелии, Валдая, Подмоскovie; озера и термальные источники Камчатки; оз. Байкал и др.) для взятия образцов и дальнейшего выделения из них липидосодержащих водорослей с использованием предложенной авторами методики цитохимического окрашивания клеток микроводорослей судановыми красителями. Ранее нами было показано, что использование Судана черного Б для качественного определения наличия липидов в клетках микроводорослей дает возможность выявить уже в пробах из природных источников потенциальных продуцентов липидов без тотального выделения всех культур, что существенно сокращает объем работы [14]. Установлено, что данные, полученные с использованием этого качественного метода, совпадают с количественным определением липидов в микроводорослях, что говорит о возможности использования его в альгологической практике при скрининге продуцентов липидов.

Выделение альгологически чистых культур микроводорослей для дальнейшего экспериментального исследования проводили из накопительных культур. Для этого отобранными в природной среде образцами засеивали конические колбы со 100 мл стерильной жидкой питательной среды BG-11 [13]. Образцы культивировали на качалках в течение 3 недель при освещении лампами ДРЛФ-400 интенсивностью 50-60 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{c})$ и температуре 28 °C. Из выращенной накопительной культуры брали 10 мл посевного материала и повторно засеивали конические колбы со 100 мл той же среды и культивировали аналогичным способом. Полученные накопительные культуры в дальнейшем были проанализированы по упомянутой выше методике пре-скрининга на основе окрашивания клеток судановыми красителями [14]. Несколько последующих пересевов изолированных колоний на аналогичную среду позволили получить серию альгологически чистых культур микроводорослей, которые дополнили коллекцию НИЛ ВИЭ и стали объектом дальнейших исследований. В этой работе мы расширили спектр исследуемых культур водорослей из других таксонов (коллекция НИЛ ВИЭ):

Stigeoclonium sp. um. rsemsu St-m-13/11.
Chlorella sp. um. rsemsu Chl-1/11-B.
Elliptochloris subsphaerica um. rsemsu N-1/11 B.
Haematococcus pluvialis um. rsemsu Hp-1/11.
Chlamydomonas globosa um. rsemsu Chlam-15/11.
Geminella pulchra um. rsemsu Pz-6.
Chlamydomodium starrii um. rsemsu Chcc-14/11.
Ettlia oleoabundans um. rsemsu Neo-ol.
Chlamydomonas sp. um. rsemsu Chlam-10/11.

Stychooccus bacillaris um. rsemsu Stych-14.
Chlorella vulgaris um. rsemsu Chv-20/11.
Botryococcus braunii um. rsemsu Bb.

Для окрашивания селективным маркером на нейтральные липиды флуоресцентным красителем Нильским красным необходимо вырастить некоторое количество биомассы нужного качества. Оптимальный способ выращивания, как уже отмечалось нами выше, – двухстадийное культивирование. Культуры *Haematococcus pluvialis um. rsemsu Hp-1/11* выращивали на среде ОНМ [15], *Chlorella vulgaris um. rsemsu Chv-20/11* – на питательной среде Тамия, остальные МКВ – на среде BG-11 [13]. На этих культурах также экспериментально изучалось воздействие следующих видов стрессоров:

- повышенной и пониженной инсоляции (от (2-4) $\mu\text{E}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$ до $(450 \pm 25) \mu\text{E}/(\text{м}^2 \cdot \text{с})$);
- субоптимальных температур (от $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ до $(9 \pm 1)^\circ\text{C}$);
- голодания по азоту и фосфору в питательных средах;
- барботаж воздуха, содержащим 2% CO_2 (об.) (табл. 2).

Результаты и обсуждение

Перечисленные выше штаммы и два штамма *Arthrospira platensis* из коллекции НИЛ ВИЭ были исследованы по следующей схеме:

- 1) описание и идентификация до рода или вида на основе морфометрических и культуральных признаков. Для восьми штаммов была проведена идентификация филогенетического положения молекулярно-биологическими методами;
- 2) экспериментальный подбор технологических параметров для получения биомассы штаммов в стандартных оптимальных условиях культивирования (1-я стадия культивирования);
- 3) экспериментальный подбор технологических параметров для получения биомассы с повышенным содержанием липидов в условиях стресса (2-я стадия культивирования) (табл. 2, № 5-12);
- 4) биохимический анализ биомассы, полученной на 1-й и 2-й стадиях культивирования;
- 5) разработка лабораторных технологических регламентов получения биомассы микроводорослей с повышенным содержанием липидов.

Анализ количественного содержания ТАГов в биомассе показал, что из 12 проанализированных штаммов достоверную положительную реакцию на стресс обнаружили 8 штаммов: *Chlorella vulgaris rsemsu Chv-20/11* (увеличение содержания нейтральных липидов с 21,0 до 33,0%); *Haematococcus pluvialis rsemsu Hp-1/11* (с 4,0 до 16,8%); *Arthrospira platensis rsemsu 1/02-II* (с 19,0 до 32,0%) и (с 19,0 до 26,1%); *Arthrospira platensis rsemsu 1/02-T* (с 36,1 до 47,1%); *Chlamydomonas globosa rsemsu Chlam-15/11*

(с 58,1 до 68,1%) и др. Причем последние две культуры могут быть кандидатами для промышленного получения биодизеля вследствие очень высокого содержания ТАГов в них. В биомассе двух штаммов МКВ содержание ТАГов снизилось (*Chlamydomonium starrii um. rsemsu Chcc-14/11* (с 43,2 до 34,0%); *Chlorella sp. um. rsemsu Chl-1/11-B* (с 31,1 до 22,5%)).

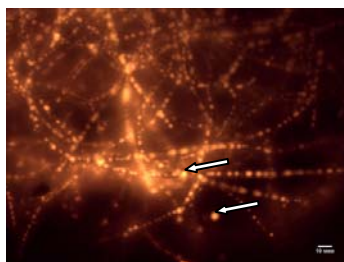
Как и в [10], для визуализации результатов воздействия стрессоров на накопление нейтральных липидов в клетках МКВ, указанных в табл. 2, применялся флуоресцентный краситель Нильский красный. В предыдущей статье подробно описана методика приготовления красителя и способ окраски. Для лучшего и беспрепятственного проникновения Нильского красного в клетки различных МКВ использовался раствор диметилсульфоксида (ДМСО). Результаты показали, что это оправдано в связи с ускорением проникновения красителя в клетки и увеличением интенсивности свечения внутриклеточных липидных глобул при флуоресцентной микроскопии. Для регистрации флуоресценции использовали люминесцентные микроскопы: 1) Leica DM 2500 (возбуждающий фильтр с длиной волны 450-490 нм, пропускающий фильтр – 510 нм); 2) Микмед-2, вар.11 (ЛОМО) при возбуждении световым пучком с длиной волны 450-480 нм и отсекающим светофильтром с полосой излучения фильтра 515 нм; 3) LSM 710 LO конфокальный Carl Zeiss (лазер с длиной волны 561 нм).

На рисунке представлены микрофотографии, отражающие эффективность выбранного качественного метода контроля за накоплением нейтральных липидов. Результаты воздействия стрессоров показаны на примере десяти штаммов микроводорослей, окрашенных флуоресцентным красителем Нильским красным: слева – исходная культура в световом микроскопе при увеличении $\times 600$ и $\times 1000$, в центре и справа – окрашенная культура в люминесцентном микроскопе после стресса при том же увеличении. Там же приведены фотографии микроводорослей, полученные с помощью конфокального микроскопа (рисунки, e, f). Стрелками на рисунке обозначены липидные гранулы/глобулы золотисто-желтого цвета, находящиеся внутри клеток. Интенсивность и площадь свечения клеток являются качественным показателем накопления ТАГов в ответ на примененные условия физиологического стресса. Таким образом, эксперименты с широким спектром МКВ из разных таксонов от сине-зеленых, зеленых до диатомовых подтверждают, что краситель Нильский красный может применяться для витальной окраски, позволяющей относительно быстро выявлять содержащиеся в клетках нейтральные липиды. Кроме того, путем окрашивания клеток Нильским красным можно определять оптимальные условия их накопления, т.е. осуществлять подбор эффективных стрессоров.

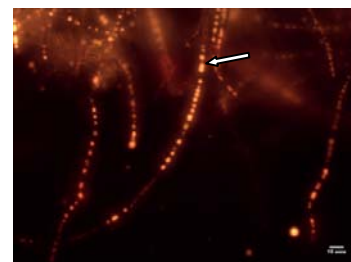




a

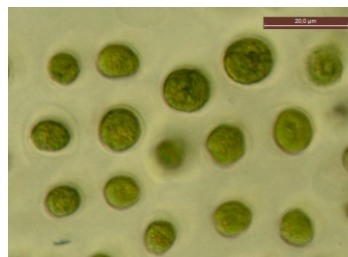


b

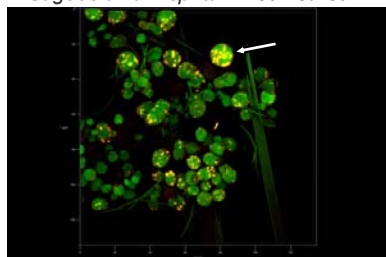


c

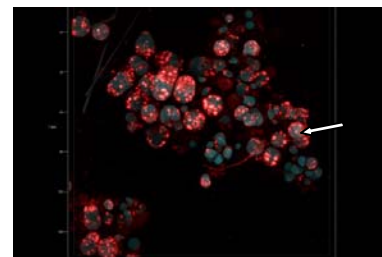
Stigeoclonium sp. um. rsemsu St-m



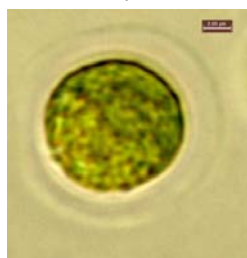
d



e



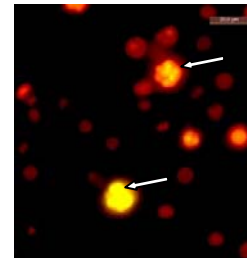
f



g



h



i

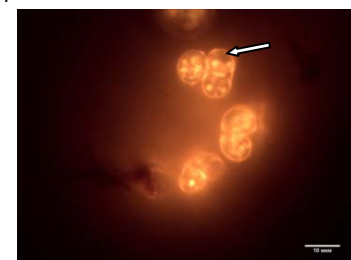
Chlamydomonas globosa um. rsemsu Chlam-15/11



j

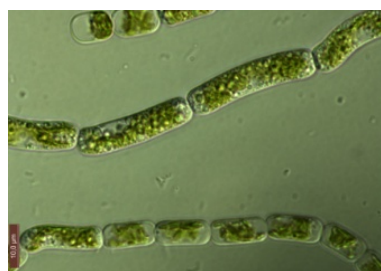


k

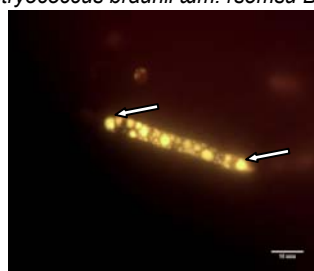


l

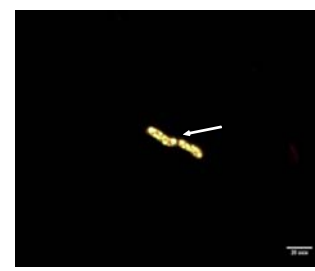
Botryococcus braunii um. rsemsu Bb13



m

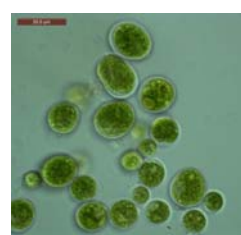


n

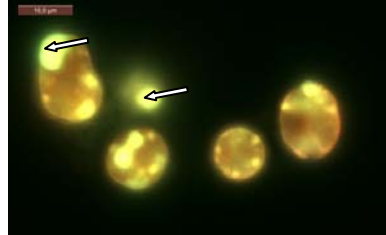


o

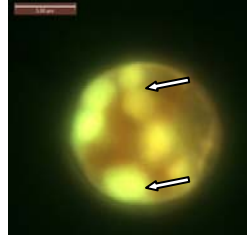
Geminella pulchra um. rsemsu Pz-6



p



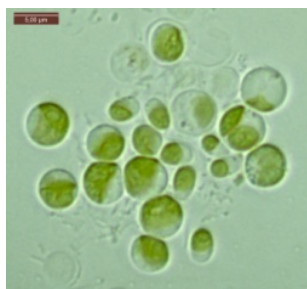
q



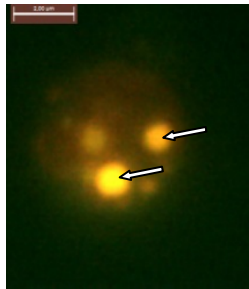
r

Chlamydomonas starrii um. rsemsu Chcc-14/11

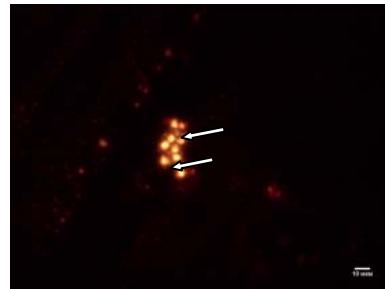




s

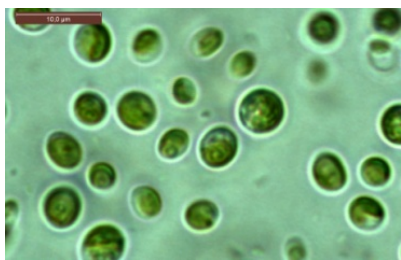


t

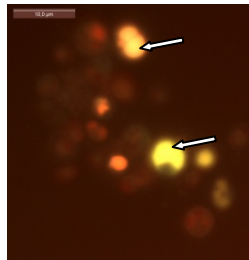


u

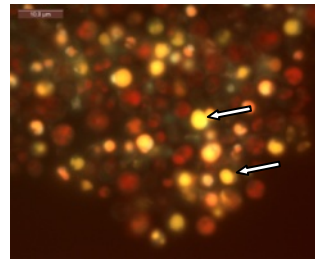
Ettlia oleoabundans um. rsemsu Neo-ol.



v

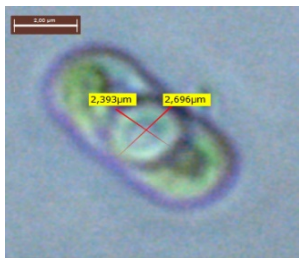


w

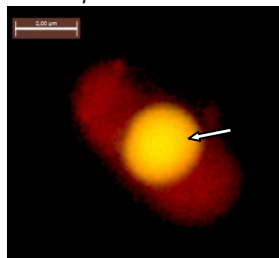


x

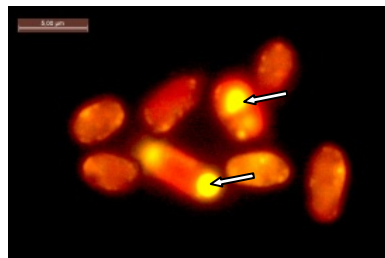
Elliptochloris subsphaerica um. rsemsu N-1/11-B



y



z

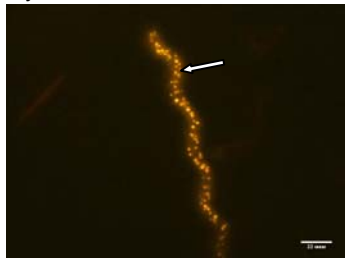


aa

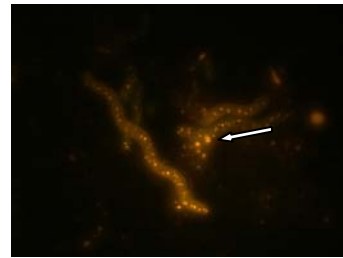
Stylococcus bacillaris um. rsemsu



bb

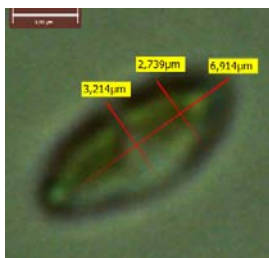


cc



dd

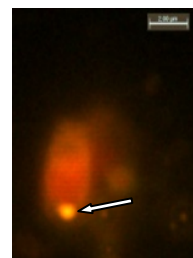
Arthrospira platensis um. rsemsu 1/02-T



ee



ff



gg

Nitzschia inconspicua um. rsemsu Pauline-Beach-Ni-14

Примеры окрашивания микроводорослей флуоресцентным красителем Нильским красным:
слева – исходная культура в световом микроскопе при увеличении x600 и x1000,
в центре и справа – окрашенная культура в люминесцентном микроскопе после стресса при увеличении x600 и x1000;
e, f – фото в конфокальном микроскопе; стрелками обозначены липидные гранулы желто-золотистого цвета

Examples of staining microalgae fluorescent dye Nile red:
left – the original culture in a light microscope at x600, and x1000,
in the center and the right – dyed culture fluorescence microscope after the stress by increasing the x600, and x1000;
e, f – photos in the confocal microscope; arrows indicate the lipid granule yellow-golden color

Выводы

В статье рассмотрены результаты поиска оптимальных условий для индукции липидов в выделенных штаммах микроводорослей. Показан спектр использованных стрессоров, обеспечивающих накопление липидов при двухстадийном культивировании микроводорослей. Положительную реакцию на стресс обнаружили 8 штаммов, в двух штаммах содержание липидов снизилось. При этом некоторые из исследуемых культур под влиянием выбранных стрессоров могут аккумулировать в клетках нейтральные липиды до промышленно значимых количеств: *Arthrospira platensis* rsemsu 1/02-T (до 47,1%), *Chlamydomonas globosa* rsemsu Chlam-15/11 (до 68,1%). Реакция на созданный стресс, по-видимому, является видо- и штаммоспецифичной, и параметры стресса требуют тщательного экспериментального подбора для каждой культуры.

Качественным показателем накопления ТАГов в ответ на примененные условия физиологического стресса является интенсивность и площадь свечения клеток культур, окрашенных Нильским красным. Этот краситель может применяться для витальной окраски, позволяющей относительно быстро выявлять содержащиеся в клетках нейтральные липиды и, таким образом, осуществлять подбор эффективных стрессоров и разрабатывать технологии выращивания микроводорослей для промышленных целей.

Выделенные и исследованные культуры из природных источников подробно описаны и включены в коллекцию микроводорослей энергетического назначения НИЛ ВИЭ географического факультета МГУ. Определены условия хранения и поддержания культур в коллекции.

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 15-08-02596.

Список литературы

1. Чернова Н.И., Киселева С.В., Коробкова Т.П., Зайцев С.И. Микроводоросли в качестве сырья для получения биотоплива // Альтернативная энергетика и экология – ISJAE. 2008. № 9. С. 68-74.
2. Третьяков В.Ф. Конверсия биоэтанола в автомобильный бензин и реактивное топливо. Доклад на Международном конгрессе «Биомасса: топливо и энергия – 2013» (16-17 апреля 2013 г.).
3. Соловченко А., Чивкунова О., Семенова Л. и др. Влияние стрессов на содержание пигментов и жирных кислот липидов в клетках микроводоросли *Desmodesmus* sp из беломорского гидроида // Физиология растений. 2013. Т. 60, № 3. С. 1-10.
4. Solovchenko A., Lukyanov A., Solovchenko O. et al. Interactive effects of salinity, high light and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CALA 804 // European Journal of Lipid Science and Technology. 2014. Vol. 116, no. 5. P. 635-644.
5. Widjaja A., Chien C.-C., Ju Y.-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* // J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 2009. Vol. 40. P. 13-20.
6. Singh S.P., Singh P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015. Vol. 50. P. 431-444.
7. Sharma Kalpesh K., Holger Schuhmann and Peer M. Schenk. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production // Energies. 2012. Vol. 5. P. 1532-1553; doi:10.3390/en5051532.

References

1. Černova N.I., Kiseleva S.V., Korobkova T.P., Zajcev S.I. Mikrovodorosli v kačestve syr'â dlâ polučeniâ biotopliva // Al'ternativnââ ènergetikâ i èkologiâ – ISJAE. 2008. № 9. S. 68-74.
2. Tret'âkov V.F. Konversiâ bioètanola v avtomobil'nyj benzin i reaktivnoe toplivo. Doklad na Meždunarodnom kongresse «Biomassa: toplivo i ènergiâ – 2013» (16-17 aprilâ 2013 g.).
3. Solovčenko A., Čivkunova O., Semenova L. i dr. Vliânne stressov na soderžanie pigmentov i žirnyh kislot lipidov v kletkah mikrovodorosli *Desmodesmus* sp iz belomorskogo gidroida // Fiziologijâ rastenij. 2013. T. 60, № 3. S. 1-10.
4. Solovchenko A., Lukyanov A., Solovchenko O. et al. Interactive effects of salinity, high light and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CALA 804 // European Journal of Lipid Science and Technology. 2014. Vol. 116, no. 5. P. 635-644.
5. Widjaja A., Chien C.-C., Ju Y.-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* // J. Taiwan Inst. Chem. Eng. 2009. Vol. 40. P. 13-20.
6. Singh S.P., Singh P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015. Vol. 50. P. 431-444.
7. Sharma Kalpesh K., Holger Schuhmann and Peer M. Schenk. High Lipid Induction in Microalgae for Biodiesel Production // Energies. 2012. Vol. 5. P. 1532-1553; doi:10.3390/en5051532.

8. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010. Vol. 14. P. 557-577.

9. Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor // Biotechnol. Bioeng. 2009. Vol. 102. P. 100-112.

10. Чернова Н.И., Киселева С.В., Зайцев С.И. Проблемы получения биотоплива третьего поколения: воздействие стрессоров на накопление нейтральных липидов в сине-зеленых водорослях (цианобактериях) // Альтернативная энергетика и экология – ISJAE. 2014. № 12. С. 70-83.

11. Чернова Н.И., Коробкова Т.П., Радомский Н.В., Киселева С.В., Зайцев С.И., Гайнанова О.Ю. Использование способа двухстадийного культивирования в поиске перспективных штаммов микроводорослей для производства биотоплива. Труды 8-й Межд. научно-техн. конф. «Энергообеспечение и энергосбережение в сельском хозяйстве». Часть 4. ВИЭ. Местные энергоресурсы. Экология. М.: ГНУ ВИЭСХ, 2012. С. 196-203.

12. Raslavicius L., Semenov V.G., Chernova N.I., Keršys A., Kopeyka A.K. The Promise and Challenges of Algae for Transportation Biofuels / Transport Means. Proceedings of 17th International Conference. October 24-25, «Technologija» Kaunas, Lithuania, 2013. P. 83-87.

13. Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. М.: ИФР РАН, 1991. С. 48, 54, 55.

14. Коробкова Т.П. Метод определения нейтральных липидов при первичном скрининге липидообразующих микроводорослей // Возобновляемые энергоресурсы атмосферы, гидросферы, биосферы: лабораторный практикум / Под ред. А.А. Соловьева. М.: «Университетская книга», 2013. С. 147-155.

15. Fábregas J., Domínguez A., Regueiro M. et al. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga Haematococcus pluvialis // Appl. Microbiol. Biotech. 2000. Vol. 53. P. 530-535.

8. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010. Vol. 14. P. 557-577.

9. Rodolfi L., Chini Zittelli G., Bassi N., Padovani G., Biondi N., Bonini G., Tredici M.R. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor // Biotechnol. Bioeng. 2009. Vol. 102. P. 100-112.

10. Černova N.I., Kiseleva S.V., Zajcev S.I. Problemy polučeniâ biotopliva tret'ego pokoleniâ: vozdejstvie stressorov na nakoplenie nejtral'nyh lipidov v sine-zelenyh vodoroslâh (cianobakteriâh) // Al'ternativnââ ènergetika i èkologiâ – ISJAE. 2014. № 12. S. 70-83.

11. Černova N.I., Korobkova T.P., Radomskij N.V., Kiseleva S.V., Zajcev S.I., Gajnanova O.Û. Ispol'zovanie sposoba dvuhstadijnogo kul'tivirovaniâ v poiske perspektivnyh štammov mikrovodoroslej dlâ proizvodstva biotopliva. Trudy 8-j Mežd. naučno-tehn. konf. «Ènergoobespečenie i ènergosbereženie v sel'skom hozâjstve». Čast' 4. VIÈ. Mestnye ènergoresursy. Èkologiâ. M.: GNU VIÈSH, 2012. S. 196-203.

12. Raslavicius L., Semenov V.G., Chernova N.I., Keršys A., Kopeyka A.K. The Promise and Challenges of Algae for Transportation Biofuels / Transport Means. Proceedings of 17th International Conference. October 24-25, «Technologija» Kaunas, Lithuania, 2013. P. 83-87.

13. Katalog kul'tur mikrovodoroslej v kollekcijâh SSSR. M.: IFR RAN, 1991. S. 48, 54, 55.

14. Korobkova T.P. Metod opredeleniâ nejtral'nyh lipidov pri pervičnom skrininge lipidoobrazuû-ših mikrovodoroslej // Vozobnovlâemye ènergoresursy atmosfery, gidrosfery, biosfery: laboratornyj praktikum / Pod red. A.A. Solov'eva. M.: «Universitetskaâ kniga», 2013. S. 147-155.

15. Fábregas J., Domínguez A., Regueiro M. et al. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga Haematococcus pluvialis // Appl. Microbiol. Biotech. 2000. Vol. 53. P. 530-535.

Транслитерация по ISO 9:1995

