

ВМІСТ НУТРИЄНТІВ У БІОМАСІ *DESMODESMUS ARMATUS* (CHOD.) HEGEW. ТА *ACUTODESMUS DIMORPHUS* (TURPIN) TSARENKO, КУЛЬТИВОВАНИЙ НА СКИДНІЙ ВОДІ ІЗ УЗВ

Л. М. ЧЕБАН, І. В. МАЛІЩУК, О. Е. ГРИНЬКО, М. М. МАРЧЕНКО

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: l.cheban@chnu.edu.ua

Показана можливість використання скидної води із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ) в якості живильного середовища для культивування *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko. Досліджувані водорості вирощували на штучному середовищі Фітцджеральда № 11 в модифікації Цендера і Горхема та на воді із установок замкнутого водопостачання, стандартизований за показниками рН та загальної мінералізації. В процесі культивування *D. armatus* та *A. dimorphus* спостерігали поступове збільшення кількості загального білку, що сягала свого максимуму в стаціонарній фазі росту культури. Максимальний вміст загального білку був відмічений на 40-ву добу культивування та становив близько 50 % сухої маси обох водоростей. В цей час, у біомасі обох видів водоростей виявлено та ідентифіковано 17 протейногенних амінокислот, серед яких 9 заміними та 8 есенціальних. Якісний склад амінокислот біомаси водоростей не залежав від типу застосованого живильного середовища. При вирощуванні на скидній воді із УЗВ культури *D. armatus* та *A. dimorphus* відзначалися децю нижчими продукційними характеристиками, проте вартість її біомаси значно нижча, ніж на стандартному живильному середовищі. Отримані таким чином продуктивні культури водоростей характеризуються достатньою кількістю білка та широким спектром амінокислот і можуть бути використані як кормовий об'єкт в аквакультурі.

Ключові слова: *Desmodesmus armatus*, *Acutodesmus dimorphus*, білок, амінокислоти, ліпіди, вуглеводи, скидна вода із рибоводної установки замкнутого водопостачання.

Вступ. Розробка методів раціонального використання та відтворення водних біоресурсів є одним із пріоритетних напрямків сучасної біотехнології та аквакультури. В структурі водних біоресурсів одноклітинні водорості вивчаються головним чином як кормова база планктонідних риб, молюсків та зоопланктону (Минюк, 2008). Серед альгокультур найчастіше як корм для зоопланктону використовують представників хлорококових водоростей, зокрема хлорелу, що є традиційним об'єктом в аквакультурі (Brown et al, 2002). Однак і серед інших представників зелених водоростей є велика кількість перспективних родів, які можна залучати до культивування в умовах аквакультури. Так, біомаса протококових водоростей родів *Desmodesmus* *Acutodesmus* є цінним джерелом білків, амінокислот, пігментів, зокрема каротиноїдів, вітамінів та поліненасичених жирних кислот (Brown et al, 1997). Крім цього, невеликі розміри клітин дозволяють використовувати окремі їх види як збалансовану кормову добавку чи стартові живі корми для молоді риб, як безпосередньо, так і

опосередковано (через збагачення зоопланктону) (Минюк, 2008).

Для інтенсивного вирощування протикокових водоростей у промисловій культурі й подальшого використання їхньої біомаси важливе значення має склад живильного середовища, а також умови культивування. Зміна складу середовища культивування мікрводоростей призводить до змін інтенсивності та характеру приросту біомаси, процесів фотосинтезу, дихання, біосинтезу органічних речовин (Mallick, 2002, Toyub et al, 2008).

Застосування для культивування мікрводоростей альтернативних живильних середовищ, таких як скидні води різного походження, дозволяє забезпечити альгокультури необхідними мінеральними елементами, а також значно знизити собівартість отримання біомаси водоростей (Голуб, 2013). Під час роботи рибоводних установок замкнутого водопостачання частину води періодично потрібно замінювати. Воду, яка скидається, можна використовувати як дешеве альтернативне середовище традиційним

середовищам культивування гідробіонтів (Чебан та ін., 2014). Така вода із УЗВ забруднена, як правило, тільки біогенами, а це робить її ідеальним живильним середовищем для зелених мікродоростей, які дуже ефективно усувають забруднення води, фіксуючи при цьому біогени у своїй масі.

Метою роботи було дослідження нутрієнтного складу біомаси *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* за умов культивування на скидній воді із УЗВ.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проводили з використанням альгологічно чистих культур протококових водоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* (Turpin) Tsarenko, отриманих з колекції (IBASH-A) Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

Як живильне середовище для культивування мікродоростей використовували скидну воду із рибоводної установки замкнутого водопостачання, стандартизовану за показниками рН (іономір U-160 MU) та загальної мінералізації (кондуктометр Water Quality Tester COM – 100). В якості середовища порівняння використовували середовище Фітцджеральда № 11 у модифікації Цендера та Горхема (Золотарьова, 2008).

Всі маніпуляції, пов'язані із висівом культури, виконувались в умовах стерильності. Співвідношення інокулят: живильне середовище становило 1:10 (Чебан та ін., 2014).

Культивування проводили в умовах кліматичної кімнати при 16-ти годинному фотоперіоді, освітленні люмінесцентними лампами 2500 – 4000 лк та температурі 24 ± 2 °С.

Виділення клітин водоростей з культурального середовища проводили центрифугуванням при 8 тис. об./хв. протягом 15 хв на Biofuga stratos “Herauses”. Після центрифугування біомасу мікродоростей дезінтегрували на УЗДН-2Т. У оводнених клітинах визначали вміст загального білку за Лоурі (Біохімія гідробіонтів, 2009), ліпідів (Knight et all, 1972) та вуглеводів (Pons et all, 1981).

Гідроліз амінокислот здійснювали концентрованою хлористоводневою кислотою при температурі 106 °С протягом 24 годин. Загальний амінокислотний склад визначали методом іонообмінної рідинно-колонної хроматографії на автоматичному аналізаторі

амінокислот Т 339 (Прага, Чехія) на базі Інституту Біохімії імені О.В. Палладіна НАН України. Для реєстрації амінокислот у елюатах використовували метод детекції нінгідрином (Козаренко, 1975) Вміст окремих амінокислот виражали у відсотках від їх сумарної маси та в міліграмах на 1 г сухої речовини досліджуваних організмів. Визначення триптофану не проводили. Вираження вмісту аспарагіну та глутаміну здійснювали сукупно з аспарагіновою кислотою та глутаміновою кислотою, відповідно.

Всі розрахунки проводили в перерахунку на суху масу. Для визначення вологості та сухої маси відважені досліджувані зразки висушували при 60°C протягом 24 годин до набуття ними постійної маси.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили згідно загальноприйнятих методів, з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel та метод однофакторного дисперсного аналізу (1-way ANOVA Tukey HSD test) в пакеті прикладних програм STATISTIKA 6.0. Відмінності отриманих результатів, вірогідні при рівні значимості $p \leq 0,01$ за критерієм Ст'юдента.

Результати та їх обговорення. Мікродорості, задіяні у харчових ланцюгах у аквакультурі, повинні характеризуватись високим вмістом білку та есенціальних амінокислот. Відомо, що біомаса протикокових водоростей може містити близько 30 – 50 % білка, при цьому його кількість та амінокислотний склад може суттєво відрізнятися залежно від умов культивування та складу застосованих живильних середовищ (Becker, 2007, Cetin et all, 2015). Саме достатня кількість білка та якісний склад амінокислот і буде визначати ефективність застосованого живильного середовища та можливість подальшого використання біомаси *D. armatus* та *A. dimorphus* у харчових ланцюгах в умовах аквакультури.

Оскільки скидна вода із УЗВ містить достатню кількість азоту, фосфору та вуглецю, можна прогнозувати високий вміст загального білка та багатий амінокислотний склад для обох культур. При дослідженні ефективності культивування було відзначено підвищення вмісту білка у біомасі *D. armatus* та *A. dimorphus* в логарифмічній фазі росту культури з 10-ї по 40-ву добу, як на скидній воді із УЗВ, так і на середовищі Фітцджеральда (рис. 1.).

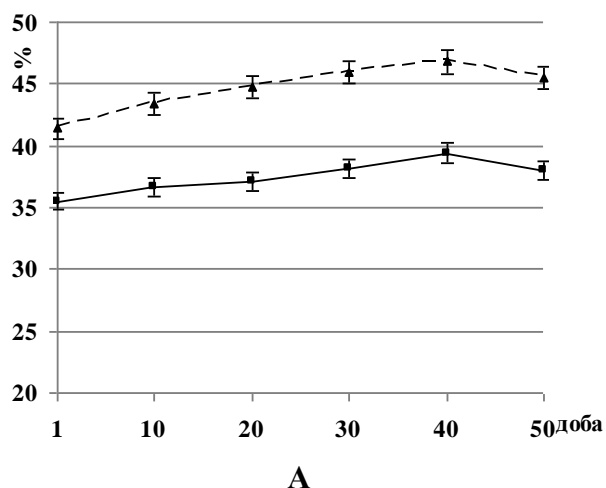


Рис. 1. Кількість загального білка у культурі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б)

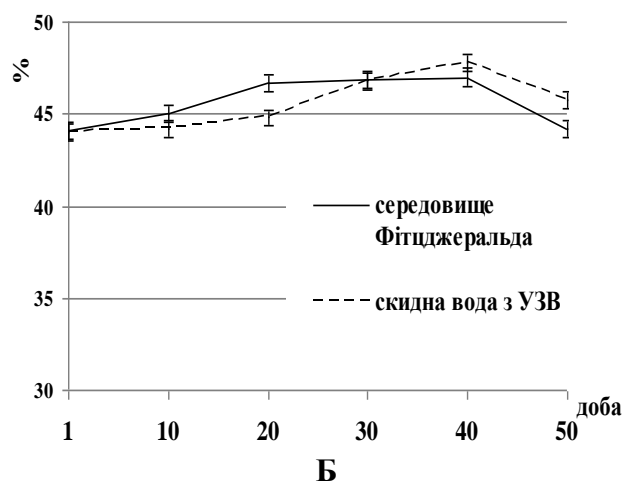


Figure 1. The content of the protein in the culture of *D. armatus* (A) та *A. dimorphus* (Б)

На цьому етапі культури мікрободоростей практично не обмежені компонентами мінерального живлення, тому кількість основних нутрієнтів, зокрема білка, в біомасі повинна характеризуватися найвищими показниками.

У біомасі *D. armatus*, культивованій на скидній воді, кількість загально білка була значно вищою, ніж при застосуванні контрольного середовища. Аналізуючи рівень накопичення білка культурою *A. dimorphus*, вирощеною на обох живильних середовищах, не відмічено достовірної різниці цих показників.

Максимальна кількість загального білка встановлена на термінальних етапах культивування водоростей. Так, у культурах *D. armatus* та *A. dimorphus*, культивованих на скидній воді із УЗВ, на 40 добу вирощування вміст білка знаходився в межах 45-50 %.

В цей час у біомасах обох культур ідентифіковано всі протеїногенні амінокислоти, як замінні, так і есенціальні (табл. 1). В силу причин методичного характеру есенціальна амінокислота цистеїн визначалась у формі цистину, а триптофан не ідентифікувався.

Таблиця 1. Амінокислотний склад біомаси *D. armatus* та *A. dimorphus*

Table 1. Amino acid composition in the biomass of *D. armatus* and *A. dimorphus*

Амінокислоти	<i>D. armatus</i>		<i>A. dimorphus</i>	
	Скидна вода із УЗВ, мг/г	Середовище Фітцджеральда, мг/г	Скидна вода із УЗВ, мг/г	Середовище Фітцджеральда, мг/г
Lys	0,148*	0,106	0,143	0,157
His	0,038	0,021	0,029	0,021
Arg	0,146*	0,086	0,129	0,123
Asp*	0,322*	0,243	0,158*	0,176
Thr	0,160*	0,119	0,097	0,107
Ser	0,153*	0,117	0,095*	0,128
Glu*	0,350*	0,258	0,327	0,348
Pro	0,139	0,116	0,152	0,172
Gly	0,183	0,152	0,129*	0,162
Ala	0,245*	0,207	0,203	0,214
Cys2	0,010	0,006	0,016*	0,009
Val	0,084	0,067	0,112	0,122
Met	0,008	0,006	0,023*	0,003
Ile	0,045	0,036	0,045	0,047
Leu*	0,189	0,152	0,157	0,185
Tyr	0,083	0,058	0,069	0,045
Phe	0,114*	0,088	0,087*	0,112
Sum	2,416*	1,840	1,972*	2,132

Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольного середовища Фітцджеральда
 Note: * - significant difference regarding the control medium Fitzgerald

Нами відмічено, що якісний склад амінокислот не залежав від типу застосованого середовища і був подібним в обох досліджуваних культурах. Однак кількісні показники напряду залежали від видових особливостей та умов культивування. Так, у культурі *D. armatus* вміст аспартату та глутамату був домінуючим і складав відповідно 0,322 та 0,350 мг/г сухої маси. Для культури *A. dimorphus* домінуючим виявився вміст аланіну та глутамінової кислоти – 0,203 та 0,327 мг/г сухої маси відповідно.

Серед незамінних амінокислот максимальним вмістом характеризувався лейцин. При цьому його кількість у біомасі *D. armatus*, культивованій на скидній воді із УЗВ, становила 0,189 мг/г, що приблизно у 1,5 рази більше, ніж за умов використання контрольного середовища. У біомасі *A. dimorphus* вміст лейцину навпаки був більшим за умов застосування контрольного середовища.

На думку багатьох авторів, біомаса більшості видів водоростей містить слідові кількості метіоніну та триптофану (Золотарьова, 2008). Тому цікавим виявився факт підвищеного вмісту метіоніну у біомасі *A. dimorphus*, вирощеної на скидній воді із УЗВ.

Композиція амінокислот даних видів дуже подібна до такої, наприклад у білку моллюсків (Brown et al, 2002). Це вказує на те, що білок та його амінокислотний склад є тим чинником, який визначає поживну цінність кормових видів водоростей.

Часто підвищений вміст білків у біомасі на термінальних етапах культивування зумовлений перерозподілом профілю нутрієнтів за рахунок нерівномірного використання мінеральних компонентів живильного середовища (Мушак, 2007). Так, наприклад, недостатня кількість азоту

та фосфору у середовищі неминуче призводить до збільшення кількості ліпідів у біомасі водоростей (Минюк, 2008). Цей факт є важливим, коли накопичення біомаси водоростей проводиться з метою отримання поновлюваних джерел енергії. Однак, для кормових організмів визначальним є максимальний вміст у клітинах білків. Порівнюючи показники нутрієнтного профілю, встановлено переважання кількості білків у біомасі обох досліджуваних культур, незалежно від застосованого живильного середовища.

Співвідношення основних нутрієнтів у біомасі *D. armatus* та *A. dimorphus* було подібним на обох застосованих середовищах та залишалось типовим для протикокових водоростей. Дещо вищий рівень ліпідів порівняно із вуглеводами у біомасі *A. dimorphus*, ймовірно зумовлений видовими особливостями альгокультури. У обох культурах кількість вуглеводів та ліпідів достовірно не відрізнялася та не залежала від застосованого середовища.

Отже, при вирощуванні на скидній воді із УЗВ культура *D. armatus* та *A. dimorphus* відзначається дещо нижчими продукційними характеристиками, проте вартість її біомаси значно нижча, ніж при використанні стандартного живильного середовища.

Достатньо високий вміст загального білка та широкий спектр амінокислот у клітинній масі *D. armatus* та *A. dimorphus*, культивованій на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання, дає можливість прогнозувати використання даних видів протикокових водоростей як кормових об'єктів для зоопланктону в умовах інтенсивної аквакультури.

Таблиця 2.
Вміст білків, ліпідів, вуглеводів у біомасі *D. armatus* та *A. dimorphus* на термінальному етапі культивування

Table. 2.
The content of proteins, lipids, sugars in the biomass of *D. armatus* and *A. dimorphus* on the terminal stage of cultivation

Досліджувані показники	<i>D. armatus</i>		<i>A. dimorphus</i>	
	Середовище Фітцджеральда	Скидна вода із УЗВ	Середовище Фітцджеральда	Скидна вода із УЗВ
білок, %	39,4 ± 1,96	46,8 ± 2,15*	47,0 ± 2,01	46,8 ± 3,12
ліпіди, %	16,7 ± 0,88	15,4 ± 0,94	24,7 ± 1,12	21,0 ± 1,38
вуглеводи, %	24,1 ± 0,94	23,3 ± 0,74	18,9 ± 0,56	16,6 ± 0,99

Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольного середовища Фітцджеральда
Note: * - significant difference regarding the control medium Fitzgerald

Список літератури:

1. Біохімія гідробіонтів; [Вогнівенко Л.П., Євтушенко М.Ю., Шевряков М.В. та ін.]. – Херсон: Олді-плюс, 2009. – 536 с.
2. Голуб Н. Б. Культивування мікродоростей за використання відходів / Н.Б. Голуб // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2013. – №. 6/10 (66). – С. 4–9.
3. Золотарьова О. К. Перспективи використання мікродоростей у біотехнології. / О. К. Золотарьова, Є. І. Шнюкова, О. О. Сиваш, Н. Ф. Михайленко / Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес., 2008. – 234 с.
4. Козаренко Т. Д. Ионообменная хроматография аминокислот / Т. Д. Козаренко. – Новосибирск: Наука, 1975. – 134 с.
5. Мушак П. А. Внутрішньовидова та міжвидова реакція альгологічно чистих культур синьозелених водоростей на зміни умов вирощування / П.А. Мушак // Укр. бот. журн. – 2007. – 64, № 1. – С. 132 – 139.
6. Чебан Л. М. Ефективність вирощування *Anabaena hassalii* (Kutz.) Wittr. за різних умов культивування / Л. М. Чебан, І. В. Маліщук, В. Р. Лисак, М. М. Марченко // Біологічні системи. – 2014. – Т.6, №2. – С.145–149.
7. Becker E.W. Micro-algae as a source of protein / E.W. Becker // Biotechnology Advances. – 2007. - № 25. - P. 207–210
8. Brown M. R. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture / M. R. Brown, L. E. Cruz- Suarez, D. Ricque-Marie, et all // Avances en Nutricion Acuicola VI. - Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. – Cancun, Quintana Roo, Mexico. – 2002. – P. 281 – 292.
9. Brown M. R. Nutritional properties of microalgae for mariculture / M. R. Brown, S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan // Aquaculture. – 1997. – Vol. 151. – P. 315 – 331.
10. Cetin A. K. Rate of *Scenedesmus acutus* (Meyen) in Cultures Exposed to Trifluralin / A. K. Cetin, N. M. Growth // Polish J. of Environ. Stud.. – 2015. - № 4. – P. 631–663.
11. Knight J.A. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids/ J.A. Knight, S. Anderson, J.M. Rawle // Clin Chem. – 1972. – P. 199 – 202.
12. Mallick N. M. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review / N. M. Mallick // BioMetals. – 2002. – № 15. – P. 377–390.
13. Pons A. A method for the simultaneous determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent / A. Pons, P Roca, A. Palou, M. Alemany // J. Biochem Biophys Methods – 1981. – C. 227 – 231.
14. Toyub M. A. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media / M. A. Toyub, M. I. Miah, M. A. Habib // Bang. J. Anim. Sci. – 2008. – № 37 (1). – P. 86–93.
1. Becker E.W. Micro-algae as a source of protein / E.W. Becker // Biotechnology Advances. – 2007. - № 25. - P. 207–210
2. Biochemistry of gydrobionts /Vognyvenko L.P., Evtushenko M.Y., Shevryakov M.V., et all – Kherson: Oldi-press. – 2009. – 536p.
3. Brown M. R. Nutritional properties of microalgae for mariculture / M. R. Brown, S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan // Aquaculture. – 1997. – Vol. 151. – P. 315 – 331.
4. Brown M. R. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture / M. R. Brown, L. E. Cruz- Suarez, D. Ricque-Marie, et all // Avances en Nutricion Acuicola VI. - Memorias del VI Simposium Internacional de Nutricion Acuicola. – Cancun, Quintana Roo, Mexico. – 2002. – P. 281 – 292.
5. Cetin A. K. Rate of *Scenedesmus acutus* (Meyen) in Cultures Exposed to Trifluralin / A. K. Cetin, N. M. Growth // Polish J. of Environ. Stud.. – 2015. - № 4. – P. 631–663.
6. Cheban L., Malischuk I., Lisak V., Marchenko M. 2014 - Efficiency growing of *Anabaena hassalii* (Kutz.) Wittr. under different culture conditions - Biological systems 6 (2): 145–149.
7. Golub N. 2013 - The cultivation of microalgae using of waste - East - European advanced technology magazine 6/10 (66): 4 – 9.
8. Knight J.A. Chemical basis of the sulfo-phosphovanillin reaction for estimating total serum lipids/ J.A. Knight, S. Anderson, J.M. Rawle // Clin Chem. – 1972. – P. 199 – 202.
9. Kozarenko T.D. Ion-exchange chromatography of amino acids / T.D. Kozarenko. – Novosybyrsk: Nauka, 1975. – 134p.
10. Mallick N. M. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review / N. M. Mallick // BioMetals. – 2002. – № 15. – P. 377–390.
11. Mushak P.A. Intraspecific and interspecific reaction algological pure cultures of chyanophyta in the changing conditions of cultivation / P.A. Mushak // Ukr. Bot. Zhurn. – 2007. – 64, 1. – P.132 – 139.
12. Pons A. A method for the simultaneous determination of total carbohydrate and glycerol in biological samples with the anthrone reagent / A. Pons, P Roca, A. Palou, M. Alemany // J. Biochem Biophys Methods – 1981. – C. 227 – 231.
13. Toyub M. A. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media / M. A. Toyub, M. I. Miah, M. A. Habib // Bang. J. Anim. Sci. – 2008. – № 37 (1). – P. 86–93.
14. Zolotareva O., Shnyukova E., Sivash O., Mihaylenko N. 2008 -. Prospects of use of microalgae in biotechnology - Alterpres, 234 p.

THE CONTENT OF NUTRIENTS IN THE BIOMASS OF *DESMODESMUS ARMATUS* (CHOD.) HEGEW. TA *ACUTODESMUS DIMORPHUS* (TURPIN) TSARENKO CULTIVATED ON THE WASTE WATER FROM RAS

L.M. Cheban, I.V. Malischuk, O.E. Grinyko, M. M. Marchenko

*It was shown the possibility of using the waste water from RAS as a culture medium for *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. and *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko cultivation. The investigated algae was grown on the Fitzgerald's artificial medium number 11 in the modification of Zehnder and Gorham and on the water from RAS (Recirculation Water System), that was standardized with the indicators pH and total mineralization. A gradual increase of the total proteins which reached their peak in the stationary phase of culture growth was noticed during the cultivation of *D. armatus* and *A. dimorphus*. The maximum content of total protein was noted on the 40th day of cultivation and was about 50% of the dry weight of both algae. At the same time, 17 proteinogenic amino acids, including 9 replaceable and 8 essential acids, were detected and identified in biomass of two species alga. the quality of the amino acids of algae biomass did not depend on the type of applied nutrient medium. While growing on the waste water from RAS lower productive characteristics of *D. armatus* ma *A. dimorphus* culturei were observed, but the mentioned way of cultivation is also more cheaper compared to standard medium. The obtained productive algae cultures characterized by a sufficient amount of protein and a wide range of amino acids and can be used as food objects in aquaculture .*

*Key words: *Desmodesmus armatus*, *Acutodesmus dimorphus*, proteins, amino acids, lipids, sugars, waste water from recirculation water system*

Одержано редколегією 20.10.2015