

# Productivity parameters of *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) under natural illumination with increased carbon supply

Original Article

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Avsiyan A.L.\*

Federal Research Center "A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS", 2 Nakhimov ave., Sevastopol, 299011, Russia

**ABSTRACT.** The development of sustainable biotechnologies for microalgal biomass production requires optimization of cultivation conditions and evaluation of productivity under natural illumination, accounting for the natural dynamics of environmental factors. The aim of this study was to assess the effect of carbon supply on production characteristics, diurnal growth dynamics, and night biomass loss during pilot-scale cultivation of the green microalga *Tetraselmis viridis* in southern Russia (mid-latitudes). The experiment was conducted in batch mode in open ponds under natural solar illumination in spring. In the control treatment, no additional carbon source other than atmospheric air was used, while in the experimental treatment, CO<sub>2</sub> was supplied to the culture with pH maintained up to 8.5. Biomass concentration, cell number, average daily productivity, daily production, night biomass loss, and photosynthetic efficiency were determined. In the control treatment, batch growth was limited to 8 days, with maximum average daily productivity of 6.5 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> and a total yield of 43.5 g m<sup>-2</sup>; growth was constrained by a pH increase to 10.5–10.8. Supplementary CO<sub>2</sub> supply increased productivity 1.4-fold (up to 9.5 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>), daily production 1.9-fold (up to 14.6 g m<sup>-2</sup>), maximum biomass to 1.12 g L<sup>-1</sup>, and total yield 2.4-fold (103 g m<sup>-2</sup>). Meanwhile, night biomass loss decreased from 12.5 % to 9.5 % of the evening biomass, and photosynthetic efficiency increased from 7.1 % to 12 % on average (reaching up to 17 % on certain days). Under carbon-sufficient conditions, night biomass loss was positively correlated with daily production. It was also shown that photosynthetic efficiency was negatively correlated with daily irradiance. Thus, CO<sub>2</sub> enrichment of *T. viridis* culture not only overcomes carbon limitation and extends the linear growth phase but also improves solar energy utilization and reduces night losses. These findings can serve as a basis for optimizing *T. viridis* cultivation technologies in open systems for biomass production intended for aquaculture, biofuel, and other biotechnological applications.

**Keywords:** microalgae, *Tetraselmis*, pilot-scale cultivation, productivity, carbon supply

**For citation:** Avsiyan A.L. Productivity parameters of *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) under natural illumination with increased carbon supply // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 4. - P. 505-522. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-4-505

## 1. Introduction

In the modern bioeconomy, there is a steady trend toward expanding the application of microalgae and cyanobacteria in the food industry, agriculture and aquaculture, pharmacy and nutraceutical production, bioremediation, and biofuel development (López-Hernández et al., 2022). The microalga *Tetraselmis viridis* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) is a promising candidate for algal biotechnology and is also considered a potential feedstock for biofuel production (Isdepsky and Borowitzka, 2019) due to its rapid growth and high lipid content.

The broad tolerance of *Tetraselmis* species to salinity and temperature fluctuations facilitates their use in large-scale biotechnological production (Mehariya et al., 2024). Owing to its high nutritional value, including polyunsaturated fatty acids, *Tetraselmis* is widely used as a feed organism in aquaculture (Tulli et al., 2012) and also shows potential for the enrichment of functional foods (Paterson et al., 2023).

Sustainable production of microalgal biomass and valuable components requires the development of cultivation technologies that account for species-specific strain characteristics (productivity, environmental requirements), cultivation systems (photobioreactor

\*Corresponding author. E-mail address: [anna\\_avs@ibss-ras.ru](mailto:anna_avs@ibss-ras.ru) (A.L. Avsiyan)

Received: June 29, 2026;

Accepted after revised: July 28, 2026;

Available online: August 28, 2026

© Author(s) 2026. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



construction, cultivation mode), and the climatic features of the cultivation site, particularly, diurnal and seasonal dynamics of illumination and temperature. Most biotechnological production facilities for microalgae and cyanobacteria operate using solar energy, employing either open raceway ponds or closed photobioreactors (Novoveská et al., 2023). Although microalgae utilize solar energy efficiently under natural illumination, which significantly decreases operational costs compared to artificial lighting, biomass loss occurs during the night due to dark respiration (Edmundson and Huesemann, 2015). Furthermore, under pilot-scale conditions, culture productivity is influenced by variable environmental factors (light intensity, temperature), scaling-up effects, and the supply of carbon nutrition necessary for photosynthesis. However, laboratory conditions do not allow accurate prediction of strain productivity in the dynamically changing environment of open ponds. Therefore, trials under natural illumination and the development of cultivation regimes that account for real-time diurnal fluctuations in light and temperature are essential (Holdmann et al., 2019; Sarker and Kaparaju, 2023). Southern Russia, and particularly the Crimean region, offers several advantages for biotechnological microalgae production under natural light: sufficient daylength and solar energy input, a mild climate that enables biomass harvesting even during autumn and spring months, and proximity to seawater sources for the cultivation of marine microalgal species.

Even when light intensity and mineral nutrient availability are sufficient, a lack of a carbon source can limit production characteristics. Increased carbon availability in the culture medium can be achieved by supplying gaseous  $\text{CO}_2$  or bicarbonates in photoautotrophic cultures, or by adding organic carbon sources (e.g., glucose, glycerol) in mixotrophic cultures of microalgae and cyanobacteria (Agbebi et al., 2022; Zhu et al., 2023). The use of  $\text{CO}_2$  as an inorganic carbon source in microalgae and cyanobacteria cultivation not only eliminates growth limitation caused by carbon depletion but also enables carbon dioxide sequestration (Agbebi et al., 2022). The efficiency of  $\text{CO}_2$  sequestration and the productivity of microalgal cultures depend on a complex of factors, including the method of carbon delivery to the cultivation system (Zheng et al., 2018), as well as the photobioreactor design, light intensity, temperature, and the physiological characteristics of the microalgal strain used (Zhu et al., 2023; Sarmah and Panda, 2026).

Studies on the growth of *T. viridis* in open ponds under natural illumination are rather scarce. For instance, the study (Zhondareva and Trenkenshu, 2019) investigated growth during the summer period but did not assess the diurnal dynamics of production characteristics. Meanwhile, the diurnal dynamics of *T. viridis* culture density was examined (Gorbunova and Avsiyan, 2022); however, the study period was limited to only three days.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of carbon supply on the production characteristics of *T. viridis* under pilotscale cultivation with natu-

ral illumination in the Sevastopol region, including the diurnal dynamics of growth parameters in relation to the natural daily cycles of solar irradiance.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microalgae strain and nutrient medium

The unialgal culture of green unicellular microalgae *Tetraselmis viridis* (Roukhijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara 1980 was used as the research object. The studied strain was IBSS-25 from the Collection of Hydrobionts of the World Ocean from the Scientific and Educational Center for Collective Use of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS (IBSS). The IBSS-25 strain was isolated from Black Sea in 1987. The nutrient medium for marine microalgae according to Trenkenshu et al. (1981) was used for cultivation, with the following ingredients, g L<sup>-1</sup>:  $\text{NaNO}_3$  – 1.8;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.3;  $\text{EDTA-Na}_2$  – 0.037;  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 0.042;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.008;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.00625;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.00183;  $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.00238). The nutrient medium was prepared using artificial seawater (Harrison et al., 1980). The inoculum used was a *T. viridis* culture that had been preadapted to cultivation conditions under natural illumination for five days. The initial biomass density of the culture was 0.09 g L<sup>-1</sup>, and the initial cell density was  $4.31 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>.

### 2.2. Cultivation conditions

Microalgae cultivation was performed in open ponds located in a greenhouse algobiotechnological unit of IBSS, Sevastopol (N. 44°61.564', E. 33°50.463') in spring (the last decade of March). The rectangular ponds (1 × 1 m) covered with polyethylene film were used as photobioreactors. The pond surface was 1 m<sup>2</sup>, the culture depth was 10 cm, the culture volume was 100 L. The growing was performed in batch mode for 12 days. The culture layer depth and volume were kept constant by daily addition of tap water prior to sampling in order to compensate water evaporation. The quality of tap water complied with SanPiN 1.2.3685-21. No additional water sterilization was performed.

The microalgal suspension was constantly mixed using aquarium electric pumps Atman AT-202 (Chuangxing Electrical Appliances Co., Ltd, China) with 1200 L h<sup>-1</sup> mixing rate. The light intensity level was determined by the natural solar irradiance, taking into account a 50% attenuation of visible light due to transmission through the polycarbonate greenhouse. The photoperiod ranged from 12 to 12.5 hours. The temperature of microalgal suspension was maintained at no less than 23 °C using an Atman AT-50W aquarium heater (Atman, China). In the control treatment, no additional carbon source was supplied; atmospheric air served as the  $\text{CO}_2$  source for growth. In the experimental treatment,  $\text{CO}_2$  was used as the inorganic carbon source, and its supply was regulated by a pH controller (Aqua Medic pH 2001, Aqua Medic, Germany), with the pH maintained within the range of 6.8 to 8.5.

When the pH in the pond rose above 8.5, a signal from the sensor was transmitted to the pH controller, which triggered the supply of gaseous CO<sub>2</sub> into the culture through a PVC tube terminating in a needle with an internal diameter of 0.5 mm. Each treatment was performed in duplicate.

### 2.3. Analytical methods and calculations

Sampling for culture density, temperature, and pH was performed five times during the daylight period, from 9:30 to 18:00 with 2–2.5 h intervals. The suspension temperature was measured using a mercury thermometer with an absolute measurement error of  $\pm 0.5$  °C, and the culture pH was measured with an I-150 pH meter (Izmeritelnaya tehnika Ltd., Russia). The total daily irradiance in the photosynthetically active radiation (PAR) range was determined based on data from the NASA POWER Project (<https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>), taking into account the attenuation of irradiance by the polycarbonate greenhouse. A 4-mm thick cellular greenhouse polycarbonate with a UV filter was used. A preliminary study showed that the photosynthetically active radiation (PAR) irradiance in the greenhouse was reduced by 50%. The dynamics of culture temperature, surface irradiance, and pH of the cell suspension during the experiment are shown in Fig. 1.

Culture density was determined photometrically. The optical density of the culture was measured in glass cuvettes with a light path length of 5 mm at a wavelength of 750 nm using a Unico-2100 photome-

ter (UNICO (Shanghai) Instrument Co. Ltd, China). To convert optical density units ( $D_{750}$ , o.d.u.) to biomass dry weight units ( $B$ , g L<sup>-1</sup>), a pre-determined conversion factor  $k = 0.8$  g L<sup>-1</sup> o.d.u.<sup>-1</sup> (Borovkov and Gevorgiz, 2005) was used:

$$B = k \cdot D_{750}.$$

Cell density ( $N$ , cell mL<sup>-1</sup>) counts were performed with hemocytometer (Gorjayeve's chamber, MiniMed, Russia) using light microscope Carl Zeiss Axiostar Plus (Carl Zeiss company, Germany) once a day. Concurrently, light microscopy was used to assess culture purity and to confirm the absence of contamination by over microalgae or protozoa.

The maximum average diurnal productivity ( $P_m$ ) was calculated by approximating biomass growth curve at the linear growth phase:

$$B = B_l + P_m \times (t - t_l),$$

where  $B_l$  is culture density at the beginning of linear growth phase;  $t_l$  is the time at the beginning of linear growth phase (Lelekov and Trenkenshu, 2007).

Specific growth rate in terms of biomass ( $\mu_B$ ) was calculated as follows:

$$\mu_B = \ln(B_2) - \ln(B_1) / t,$$

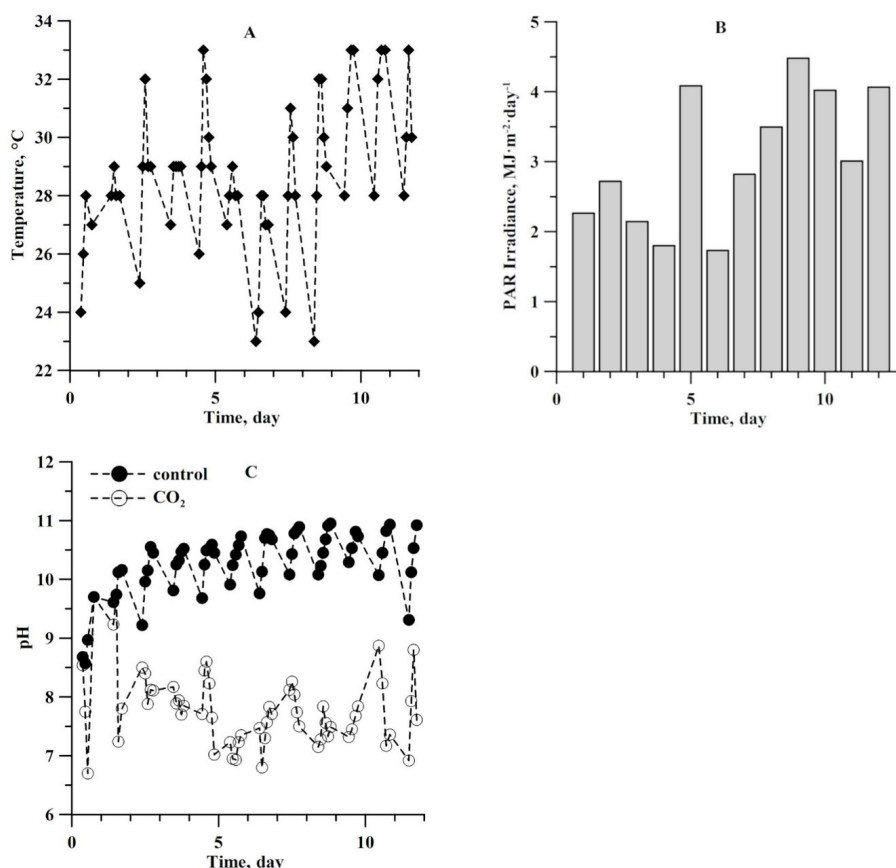
where  $B_2$  is final biomass,  $B_1$  is initial biomass,  $t$  is time.

Specific growth rate in terms of cell density ( $\mu_N$ ) was calculated as:

$$\mu_N = \ln(N_2) - \ln(N_1) / t,$$

where  $N_2$  is final cell density,  $N_1$  is initial cell density,  $t$  is time.

Total night biomass loss (NBL) as fraction of biomass at the end of light period ( $NBL_B$ ) was calculated using the equation:



**Fig.1.** Cultivation conditions: temperature of the cell suspension (A), solar irradiance of the culture surface in the PAR range (B), and pH of the cell suspension (C) during pilot-scale growth of *T. viridis* culture. CO<sub>2</sub> is a treatment with additional carbon dioxide supply.

$$NBL_B = ((B_L' - B_D) / B_L) \cdot 100\% ;$$

NBL as fraction of production in the previous light period ( $NBL_p$ ) was calculated using the equation:

$$NBL_p = ((B_L' - B_D) / (B_L' - B_D')) \cdot 100\%$$

where  $B_L'$  is culture density at the end of the previous light period,  $B_D$  is culture density at the end of dark period,  $B_D'$  is culture density at the end of the previous dark period (Qiang et al., 1996).

Daytime production was determined as the difference between culture density at the end and at the beginning of the daylight period. The calculation of culture production parameters (density, productivity) per unit area was performed taking into account a relation of 100 L m<sup>-2</sup> at a culture layer depth of 10 cm.

Photosynthetic efficiency (PE) was calculated from the daytime areal productivity (g·m<sup>-2</sup>·day<sup>-1</sup>) multiplied by the mean caloric content and divided by the solar PAR energy input per unit ground area (kJ·m<sup>-2</sup>·day<sup>-1</sup>), considering that all light energy was absorbed by the dense algal culture. The value of caloric content of the *Tetraselmis* biomass was taken as 24.2 kJ g<sup>-1</sup> (Chini Zittelli et al., 2006).

## 2.4. Statistical analyzes

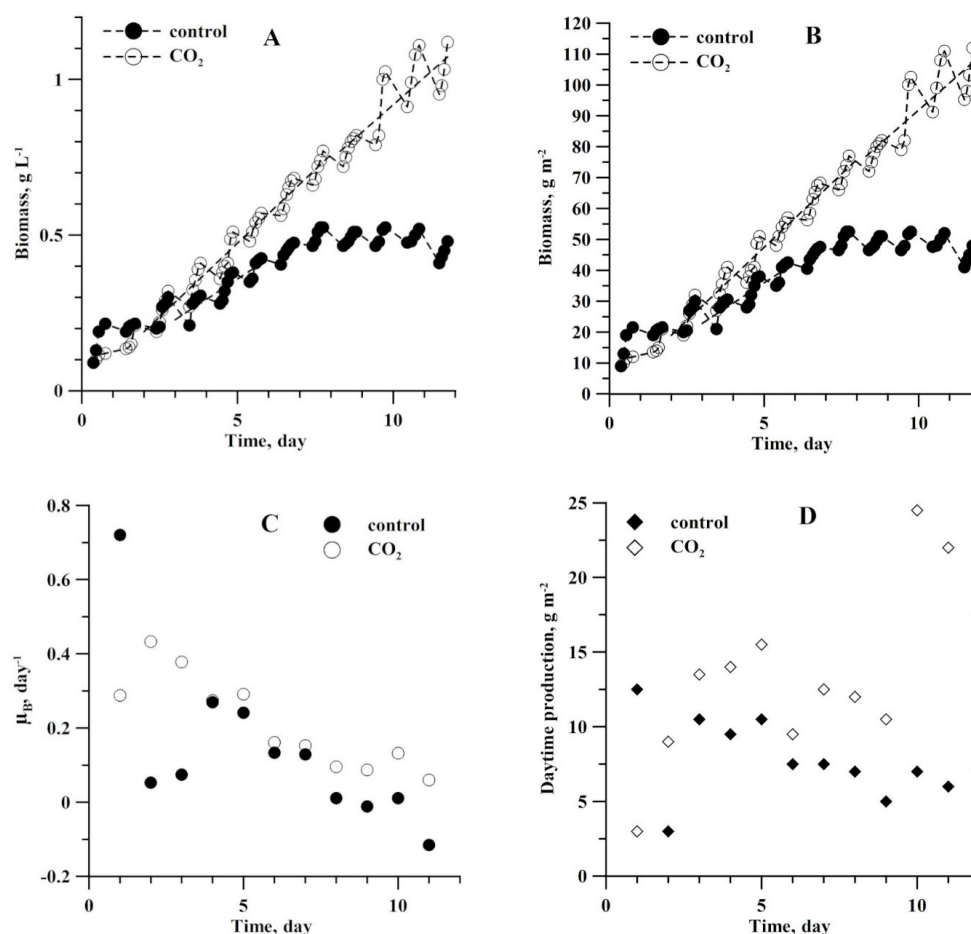
Statistical analysis of experimental data was performed using Grapher3 (Golden software) and Microsoft Excel (Microsoft office) software. Arithmetic mean ( $\bar{x}$ ), standard deviation (SD), error of the mean, confidence intervals (CI) for the mean ( $\Delta\bar{x}$ ) were esti-

mated. The significance of differences between samples was assessed using a Student's t-test at  $p < 0.05$ . Correlation analysis was carried out, Spearman correlation coefficients ( $r$ ) were calculated. All calculations were made for the significance value  $\alpha = 0.05$ .

## 3. Results

The growth parameters of *T. viridis* culture under natural illumination were assessed in open-type ponds similar in design to industrial systems. The open ponds were placed in a greenhouse to partially control the temperature regime and to protect against precipitation and contamination. The microscopic control of microalgal culture purity proved the absence of contamination by other microalgae species or protozoa in the course of all cultivation period. The microalga cultivation was carried out in spring, under a photoperiod close to 12 h (spring equinox). The total daily photosynthetically active radiation (PAR) irradiance during this season ranged from 2 to 4 MJ m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> (Fig. 1 B).

The experiment was conducted in batch mode and lasted 12 days. The experiment was terminated upon the onset of the decline phase in the control treatment. The batch growth curves of volumetric biomass concentration (dry weight) are shown in Fig. 2A. Since for pilot-scale systems the biomass concentration and productivity per unit surface area are important parameters, the areal biomass concentration was additionally calculated (Fig. 2B).



**Fig.2.** Biomass concentration dynamics per volume (A) and per surface area (B), specific growth rate (C) and daytime production (D) during batch cultivation of *T. viridis* culture under natural illumination with different carbon supply. CO<sub>2</sub> is a treatment with additional carbon dioxide supply.

In the control treatment without additional CO<sub>2</sub> supply, the linear growth phase of *T. viridis* culture in terms of biomass was observed from day 4 to day 6. The maximum average daily biomass productivity ( $P_m$ ) was 0.065 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (6.5 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>). After day 8, the culture entered the stationary phase, and by day 12 the decline phase began. The maximum specific growth rate in terms of biomass ( $\mu_B$ ) was recorded on day 1 of cultivation (0.72 day<sup>-1</sup>), decreasing to 0.01 day<sup>-1</sup> by day 8, and subsequently became close to zero or negative (Fig. 2C). The maximum biomass reached 0.525 g L<sup>-1</sup> (or 52.5 g m<sup>-2</sup> on a surface-area basis), corresponding to a total yield of 43.5 g m<sup>-2</sup> over the entire cultivation period. It should be noted, that there was no biomass accumulation after day 8. It should be noted that in the absence of CO<sub>2</sub> supply, the pH level during batch cultivation increased. After 3 days, the pH at the end of the daylight period reached values of 10.5–10.8, while decreasing to 9.7–10 during the night (Fig. 1C), due to dark respiration and CO<sub>2</sub> release into the medium by the microalgal cells.

In the treatment with additional CO<sub>2</sub> supply, a lag phase was observed on the first day of the experiment, during which the culture adapted to the increased carbon concentration. Thereafter, growth remained linear until the end of the experiment, with two distinct linear growth phases: from day 3 to day 8, with an average daily productivity of 0.095 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (9.5 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>), and from day 9 to day 12, with an average daily productivity of 0.088 g L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (8.8 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>). On average, the productivity of *T. viridis* with CO<sub>2</sub> supply was 1.4-fold higher than in the control treatment. The maximum specific growth rate in terms of biomass ( $\mu_B$ ) was 0.43 day<sup>-1</sup>, recorded on day 2, and thereafter decreased exponentially to 0.06 day<sup>-1</sup> by day 11. The maximum biomass with additional carbon supply reached 1.12 g L<sup>-1</sup> (112 g m<sup>-2</sup> on a surface-area basis). Consequently, the total yield over the entire cultivation period amounted to 103 g m<sup>-2</sup>, which was 2.4-fold higher than the total yield in the treatment without additional inorganic carbon supply.

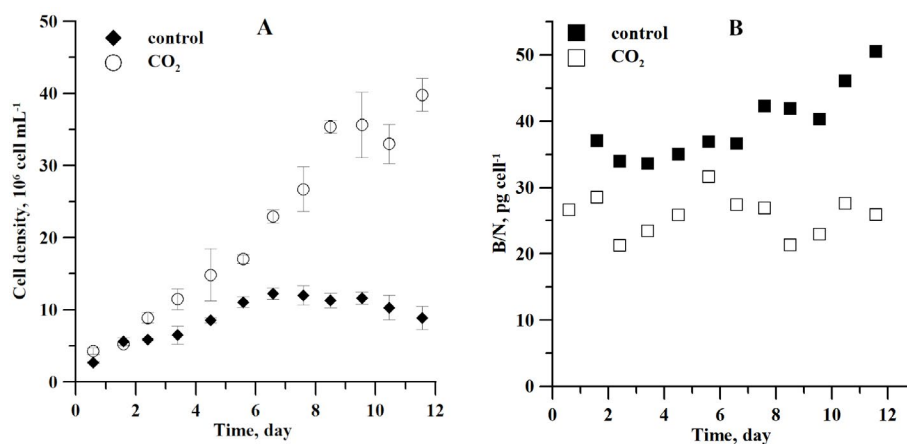
In addition to determining the culture density in terms of biomass, the dynamics of cell abundance in the culture (Fig. 3A) and the biomass to cell number ratio ( $B/N$ ), which indirectly reflects the average cell size (Fig. 3B), were assessed.

In the control treatment, linear growth of *T. viridis* cell number occurred from day 4 to day 6, similar to the linear phase of biomass growth. The maximum cell number in the control treatment reached  $12.27 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>. The specific growth rate in terms of cell number ( $\mu_N$ ) was recorded on the first day of the experiment (0.74 day<sup>-1</sup>), after which it sharply decreased, becoming zero or negative after day 7. Along with this, after day 7 an increase in the  $B/N$  ratio from 36.6 to 50.5 pg cell<sup>-1</sup> was observed, indicating an increase in cell size in the culture.

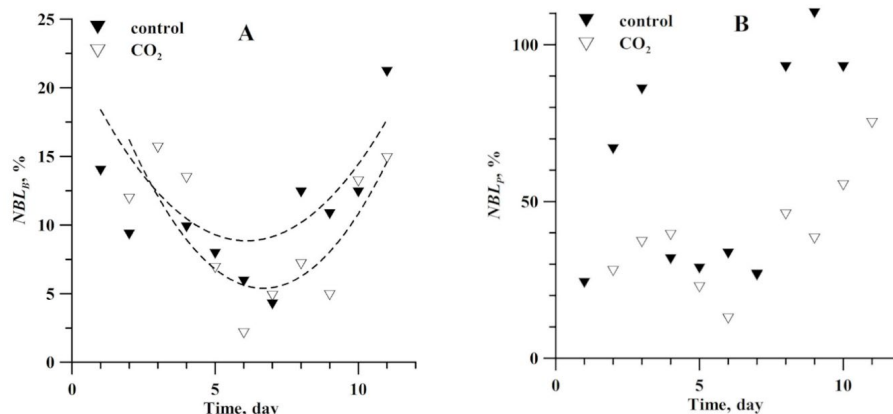
Under CO<sub>2</sub> supply, microalgal cell growth was more active than in the control. The maximum cell number reached  $39.8 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>, which was 3.2-fold higher than in the control. The maximum specific growth rate in terms of cell number ( $\mu_N$ ) was 0.53 day<sup>-1</sup>, recorded on day 2 of the experiment, consistent with the biomass-based growth rate. The biomass-to-cell number ratio ( $B/N$ ) remained more stable than in the control, ranging from 24 to 31 pg cell<sup>-1</sup>. Furthermore, during the active growth phase, the  $B/N$  ratio under CO<sub>2</sub> supply was on average 1.4-fold lower than in the control.

Based on the daily dynamics of culture density, daytime production (Fig. 2D) and night biomass loss were calculated for the *T. viridis* culture. In the control treatment, daytime production during the linear growth phase (days 4–6) was 10.2 g m<sup>-2</sup>, while the average over the entire batch cultivation period was 7.75 g m<sup>-2</sup>. Under supplemental CO<sub>2</sub> supply, daytime production was significantly higher (14.6 g m<sup>-2</sup>). Under carbon-enriched conditions, a positive correlation was observed between daily production and total daily irradiance ( $r=0.42$ ), whereas no such correlation was found in the control. In both treatments, biomass accumulation continued throughout the entire daylight period, with the highest hourly biomass increment occurring in the middle of the day (12:00–14:00).

The nighttime biomass loss (expressed as a percentage of the biomass at the end of the daylight period,  $NBL_B$ ) in the control treatment averaged 12.5 % of the biomass, whereas under CO<sub>2</sub> supply it was lower, averaging 9.5 % (Fig. 4A). In both treatments, the highest  $NBL_B$  values were observed at the beginning of batch cultivation and towards the end of the experiment, while the minimum values occurred between days 5



**Fig.3.** Dynamics of cell number (A) and the biomass/cell number ( $B/N$ ) ratio (B) during batch cultivation of *T. viridis* under natural illumination with different carbon supply. CO<sub>2</sub> is a treatment with additional carbon dioxide supply.



**Fig.4.** Night biomass loss as a fraction of biomass (A) and as a fraction of daytime production (B) in *T. viridis* batch culture under natural illumination with different carbon supply. Dashed line is a trend line. CO<sub>2</sub> is a treatment with additional carbon dioxide supply.

and 8. For the CO<sub>2</sub>-supplemented treatment, a significant correlation was found between  $NBL_B$  and daytime production ( $r=0.55$ ), whereas in the control the correlation was positive but not significant ( $r=0.23$ ).

The nighttime biomass loss as a fraction of daytime production ( $NBL_p$ ) ranged from 20 to 40 % of the daily production up to day 7, after which it increased substantially. In the treatment without additional carbon supply,  $NBL_p$  could reach 100 % and even exceed the daily production (Fig. 4B).

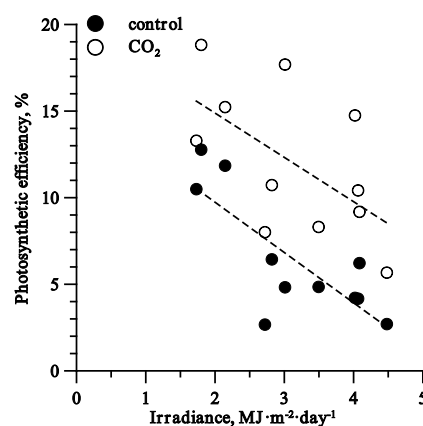
To assess the efficiency of solar energy utilization by the *T. viridis* culture, the photosynthetic efficiency was calculated. In both experimental treatments, a negative correlation was found between photosynthetic efficiency and total irradiance, with correlation coefficients of  $r=-0.79$  in the control and  $r=-0.41$  in the CO<sub>2</sub>-supplemented treatment. Thus, as insolation intensity increased, the efficiency of its conversion into biomass decreased (Fig. 5). Since upon CO<sub>2</sub> addition to the culture, daily production and growth rate on day 1 were atypically low and deviated from the general trend (Fig. 2C, Fig. 2D), the photosynthetic efficiency value on day 1 (3.2 %) was excluded from the calculation of the relationship with irradiance.

The addition of CO<sub>2</sub> enhanced photosynthetic efficiency. In the control treatment, photosynthetic efficiency varied between 2.7 and 12.8% (mean 7.1%), whereas with CO<sub>2</sub> supplementation, it ranged from 3.2 to 17.7% (mean 12%).

#### 4. Discussion

The pilot-scale experimental cultivation of *T. viridis* allowed both the assessment of its production characteristics under natural diurnal light cycles and the evaluation of the effect of inorganic carbon availability on culture growth and biomass accumulation.

Under pilot-scale conditions with natural solar illumination, supplying the microalgal *T. viridis* culture with CO<sub>2</sub> as a carbon source resulted in a substantial increase in production parameters. Specifically, the maximum average daily productivity during the linear growth phase ( $P_m$ ) increased 1.46-fold, reaching  $9.5 \text{ g m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ , while daily production rose 1.9-fold, up



**Fig.5.** Relationship between photosynthetic efficiency in *T. viridis* culture and total daily irradiance under natural illumination with different carbon supply. Dashed line are linear approximations. CO<sub>2</sub> is a treatment with additional carbon dioxide supply.

to  $14.6 \text{ g m}^{-2}$ . In the control treatment without additional carbon supply, batch growth ceased after 8 days, apparently due to carbon limitation. Owing to both a longer growth period and higher productivity, the maximum culture density under CO<sub>2</sub> supply reached  $1.12 \text{ g L}^{-1}$ , and the total biomass yield over the cultivation period ( $103 \text{ g m}^{-2}$ ) was 2.4-fold higher than that in the control.

In addition to atmospheric air, carbon supply for microalgal cultures can be provided in inorganic form (carbon dioxide or sodium bicarbonate) or as organic substrates (Agbebi et al., 2022). Supplying inorganic carbon as CO<sub>2</sub> in dense microalgal cultures not only increases the concentration of inorganic carbon in the medium but also helps to maintain an optimal pH (Moheimani, 2013a). In dense cultures of microalgae and cyanobacteria, the consumption of CO<sub>2</sub> during photosynthesis leads to a rise in pH, which in turn shifts the carbonate equilibrium toward  $\text{CO}_3^{2-}$  – a form of carbon that is unavailable to algal cells (Shiraiwa et al., 1993). Furthermore, bicarbonate uptake by cells requires additional energy expenditure for the functioning of carbonic anhydrases (Moheimani, 2013a). In the present study, it was observed that in the absence of CO<sub>2</sub> supply, pH increased both over the course of batch cultivation

and during the daylight period. At night, pH declined due to dark respiration and CO<sub>2</sub> release into the medium by the microalgal cells. A similar pattern of diurnal pH dynamics was observed in cultures of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp. (Moheimani, 2013a). It is likely that the pH rise above the optimal level limited carbon uptake and thus significantly restricted the overall biomass yield in the control treatment in the current research. An additional factor negatively affecting algal growth at elevated pH is the possible precipitation of calcium, magnesium, phosphorus, and trace element salts. The ability to grow at pH >10 in industrially significant microalgae such as *Chlorella*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis*, and cyanobacteria (*Limnospira*) may be explained both by a lower requirement for trace elements and by the release of chelating compounds into the medium, which prevent trace element precipitation (Goldman et al., 1982; Thomas et al., 2026). Nevertheless, elevated pH may promote lipid accumulation through alterations in cellular metabolism, accelerate CO<sub>2</sub> uptake from atmospheric air, and also prevent bacterial and protozoan contamination of the culture (Shiraiwa et al., 1993; Thomas et al., 2026).

The cultivation system was designed to resemble open ponds used in industrial microalgal production; therefore, tap water was used for medium preparation and to compensate for evaporation. According to local standards, drinking tap water may contain bicarbonate concentrations of up to 400 mg L<sup>-1</sup>. According to the water quality report (<https://sevvodokanal.org.ru/pages/kachestvo>), the water hardness was  $3.7 \pm 0.6$  units, which corresponds to an approximate bicarbonate concentration of 226 mg L<sup>-1</sup>. In studies on microalgal growth, bicarbonate concentrations typically range from 0.2 to 5 g L<sup>-1</sup> or higher, while concentrations below 0.5 g L<sup>-1</sup> do not significantly affect the growth rate (Borovkov et al., 2026). Thus, the bicarbonate concentration in the tap water was not high enough to influence the carbon supply of the microalgal culture.

Earlier studies on the growth of *T. viridis* in open ponds reported average daily productivity ranging from 4.2 to 14.4 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> (Zhondareva and Trenkenshu, 2019; Gorbunova and Avsiyan, 2022). However, higher maximum productivity values were observed in summer, under higher solar irradiance. In those studies, the linear growth phase was short-lived, and the maximum biomass reached 49 g m<sup>-2</sup>, which is comparable to the maximum biomass in the present control treatment but substantially lower than the maximum biomass achieved with CO<sub>2</sub> addition.

Furthermore, the production characteristics of *T. viridis* in this study are similar to those reported for other *Tetraselmis* species under natural illumination. In open raceway ponds, the productivity of *Tetraselmis suecica* was 48–92 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup>, which, at a working depth of 20 cm, corresponds to areal productivity of 9.6–18.4 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> (Cuella et al., 2015). *Tetraselmis* sp. cultivated in raceway ponds in autumn in Australia exhibited a productivity of 36 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (or 7.2 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>) without CO<sub>2</sub> addition, which is very similar to the values obtained in our control treatment

(Raes et al., 2014). The productivity of *T. suecica* in bag-type photobioreactors in Australia was approximately 110 mg L<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> (Moheimani, 2013b). Chini Zittelli et al. (2006) reported that the productivity of *T. suecica* cultivated in Italy in August reached 36–38 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>. However, that value was achieved in vertical tubular photobioreactors under higher irradiance levels.

The productivity of microalgal cultures under natural illumination is determined by both mineral and carbon nutrition conditions, as well as by the climatic factors of the cultivation site. Among the environmental factors, irradiance in the photosynthetically active radiation (PAR) range is the most important. The present study on the growth of *T. viridis* was conducted in spring under mid-latitude conditions, with an average daily PAR irradiance of 3 MJ m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>. The positive correlation between daily production and daily irradiance observed under CO<sub>2</sub> addition suggests that supplementary carbon supply at higher irradiance levels would enable higher production performance for this microalgal species.

With additional carbon supply, the *T. viridis* culture exhibited increased cell number and division rates, along with a lower B/N ratio, indicating a smaller average cell size. The reduced division rate and cell enlargement observed in the control treatment may be attributable to unfavorable conditions limiting cell division, caused by carbon substrate deficiency and elevated pH.

Growth of the *T. viridis* culture occurred throughout the entire daylight period; however, even under conditions of maximum productivity, night biomass loss ranged from 20 to 40% of the daytime production. Accordingly, harvesting in the evening is advisable to minimize such losses.

Night biomass loss in microalgal cultures often increases with growth rate due to enhanced growth respiration. For instance, a linear relationship between daily yield (productivity) and night biomass loss has been demonstrated for *Tetraselmis suecica* (Michels et al., 2014). However, the present study showed that for *T. viridis*, carbon supplementation not only increased daily and average daily production but also reduced night biomass loss. Similarly, it was shown for *Limnospira platensis* that a decrease in inorganic carbon concentration (in the form of sodium bicarbonate) led to an increase in nighttime biomass loss (Avsiyan and Gevorgiz, 2025). It is likely that carbon limitation of culture growth requires additional energy expenditure, particularly for the operation of CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms.

CO<sub>2</sub> supplementation enhanced the efficiency of solar energy utilization by the microalgal culture, with the light-to-biomass conversion efficiency reaching up to 17% (12% on average), which is a relatively high value. For comparison, growth of *Tetraselmis suecica* in tubular photobioreactors achieved a photosynthetic efficiency of 9.4% (Chini Zittelli et al., 2006).

Overall, the study demonstrated stable growth of *T. viridis* culture in open ponds during spring under the mid-latitude climatic conditions. The effect of carbon supply in the form of CO<sub>2</sub> on the production charac-

teristics of this microalga under natural solar illumination was established, enabling an increase in the productivity of cultivation systems and offering prospects for simultaneous CO<sub>2</sub> sequestration and biomass production. Future research may include evaluating the effect of carbon supply on the productivity of *T. viridis* in terms of specific biomass components, such as lipids and pigments, as well as conducting a techno-economic analysis that compares the additional operational costs against the biomass value for large-scale cultivation systems.

## 5. Conclusions

The pilot-scale cultivation of *T. viridis* under mid-latitude climate conditions revealed that supplementary carbon supply increases both productivity and maximum biomass, while also improving the efficiency of solar energy conversion. To further optimize biotechnological production systems for *T. viridis*, a more comprehensive techno-economic analysis is necessary, accounting for the costs of CO<sub>2</sub> as well as the capital investment required for the specific CO<sub>2</sub> delivery system.

## Acknowledgements

This work was carried out within the framework of IBSS state research assignment “Comprehensive study of the functioning mechanisms of marine biotechnological complexes with the aim of obtaining bioactive substances from hydrobionts” (No. 124022400152-1).

## Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Agbebi T.V., Ojo E.O., Watson I.A. 2022. Towards optimal inorganic carbon delivery to microalgae culture. *Algal Research* 67:102841. DOI: [10.1016/j.algal.2022.102841](https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102841)
- Avsiyan A.L., Gevorgiz R.G. 2025. Influence of carbon and light supply on productivity and night biomass loss in *Limnospira (Spirulina) platensis* under natural illumination. In: Baltiyskiy morskoy forum [Baltic Sea Forum]: Proceedings of the XIII International Baltic Sea Forum: in 6 volumes. Volume 3. Aquatic bioresources, aquaculture and ecology of water bodies, pp. 5–11. (in Russian)
- Borovkov A.B., Gevorgiz R.G. 2005. Production *Spirulina platensis* and *Tetraselmis viridis* by different methods cultivation. *Ekologiya morya [Ecology of the Sea]* 70: 9–13. (in Russian)
- Borovkov A.B., Rylkova O.A., Gudvilovich I.N. et al. 2026. Growth and morphometric characteristics of the microalga *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross using sodium bicarbonate as a carbon source. *Bioresource Technology Reports* 33:102615. DOI: [10.1016/j.biteb.2026.102615](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2026.102615)
- Chini Zittelli C., Rodolfi L., Biondi N. et al. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. *Aquaculture* 261(3): 932–943. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2006.08.011](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.011)
- Cuello M.C., Cosgrove J.J., Randhir A. et al. 2015. Comparison of continuous and day time only mixing on *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta) in outdoor raceway ponds. *Journal of applied phycology* 27(5): 1783–1791. DOI: [10.1007/s10811-014-0420-5](https://doi.org/10.1007/s10811-014-0420-5)
- Edmundson S.J., Huesemann M.H. 2015. The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. *Algal research* 12: 470–476. DOI: [10.1016/j.algal.2015.10.012](https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012)
- Goldman J.C., Azov Y., Riley C.B. et al. 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. *Journal of experimental marine biology and ecology* 57(1): 1–13. DOI: [10.1016/0022-0981\(82\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90140-X)
- Gorbunova S.Y., Avsiyan A.L. 2022. Diurnal dynamics of green microalga *Tetraselmis viridis* culture density in open pond monitored by optical density sensor. *Bioresource Technology Reports* 20: 101251. DOI: [10.1016/j.biteb.2022.101251](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101251)
- Harrison P.J., Waters R.E., Taylor F.J.R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *Journal of Phycology* 16: 28–35. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x)
- Holdmann C., Schmid-Staiger U., Hirth T. 2019. Outdoor microalgae cultivation at different biomass concentrations—assessment of different daily and seasonal light scenarios by modeling. *Algal Research* 38: 101405. DOI: [10.1016/j.algal.2018.101405](https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101405)
- Isdepsky A., Borowitzka M.A. 2019. In-pond strain selection of euryhaline *Tetraselmis* sp. strains for reliable long-term outdoor culture as potential sources of biofuel and other products. *Journal of Applied Phycology* 31(6): 3359–3370. DOI: [10.1007/s10811-019-01873-y](https://doi.org/10.1007/s10811-019-01873-y)
- Lelekov A.S., Trenkenshu R.P. 2007. Simplest models of microalgae growth 4. Exponential and linear growth phases of microalgae culture. *Ekologiya Morya [Ecology of the Sea]* 7: 47–49. (in Russian)
- López-Hernández J.F., Kean-Meng T., Asencio-Alcudia G.G. et al. 2022. Sustainable microalgae and cyanobacteria biotechnology. *Applied Sciences* 12(14): 6887. DOI: [10.3390/app12146887](https://doi.org/10.3390/app12146887)
- Mehariya S., Annamalai S.N., Thaher M.I. et al. 2024. A comprehensive review on versatile microalga *Tetraselmis*: Potentials applications in wastewater remediation and bulk chemical production. *Journal of Environmental Management* 365: 121520. DOI: [10.1016/j.jenvman.2024.121520](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121520)
- Michels M.H.A., Slegers P.M., Vermuë M.H. et al. 2014. Effect of biomass concentration on the productivity of *Tetraselmis suecica* in a pilot-scale tubular photobioreactor using natural sunlight. *Algal Research* 4: 12–18. DOI: [10.1016/j.algal.2013.11.011](https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.011)
- Moheimani N.R. 2013. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* 25(2): 387–398. DOI: [10.1007/s10811-012-9873-6](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9873-6)
- Moheimani N.R. 2013. Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) in bag photobioreactors. *Journal of Applied Phycology* 25(1): 167–176. DOI: [10.1007/s10811-012-9850-0](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9850-0)
- Novoveská L., Nielsen S.L., Eroldogan O.T. et al. 2023. Overview and challenges of large-scale cultivation of photosynthetic microalgae and cyanobacteria. *Marine drugs* 21(8): 445. DOI: [10.3390/md21080445](https://doi.org/10.3390/md21080445)
- Paterson S., Gómez-Cortés P., de la Fuente M.A. et al. 2023. Bioactivity and digestibility of microalgae *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. as basis of their potential as novel functional foods. *Nutrients* 15(2): 477. DOI: [10.3390/nu15020477](https://doi.org/10.3390/nu15020477)
- Qiang H., Guterman H., Richmond A. 1996. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured

at ultrahigh cell densities. *Journal of Phycology* 32(6): 1066–1073. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1996.01066.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.01066.x)

Raes E.J., Isdepsky A., Muylaert K. et al. 2014. Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. *Journal of Applied Phycology* 26(1): 247–255. DOI: [10.1007/s10811-013-0077-5](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0077-5)

Sarker N.K., Kaparaju P. 2023. A critical review on the status and progress of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors conducted over 35 years (1986–2021) *Energies* 16(7): 3105. DOI: [10.3390/en16073105](https://doi.org/10.3390/en16073105)

Sarmah M., Panda M.R. 2026. Systematic review on proliferation of microalgae and carbon sequestration potential for sustainability. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 42(3): 100. DOI: [10.1007/s11274-026-04849-6](https://doi.org/10.1007/s11274-026-04849-6)

Shiraiwa Y., Goyal A., Tolbert N.E. 1993. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake dissolved inorganic carbon. *Plant and cell physiology* 34(5): 649–657. DOI: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467)

Thomas P.K., Gerlach R., Narwani A. 2026. Hunting for Extremophiles: A Systematic Screening of Freshwater Microalgae for Tolerance to High-pH and High-Alkalinity Cultivation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 14(9): 4376–4386. DOI: [10.1021/acssuschemeng.5c09906](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c09906)

Trenkenshu R.P., Terskov I.A., Sidko F.Ya. 1981. Dense cultures of marine microalgae. *Proceedings of SB AS USSR*

(ser. Biol.) [Izvestiya SO AN SSSR (ser. Biol.)] 15(3): 75–82. (in Russian)

Tulli F., Chini Zittelli G., Giorgi G. et al. 2012. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. *Journal of aquatic food product technology* 21(3): 188–197. DOI: [10.1080/10498850.2012.664803](https://doi.org/10.1080/10498850.2012.664803)

Zheng Q., Xu X., Martin G.J. et al. 2018. Critical review of strategies for CO<sub>2</sub> delivery to large-scale microalgae cultures. *Chinese journal of chemical engineering* 26(11): 2219–2228. DOI: [10.1016/j.cjche.2018.07.013](https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.07.013)

Zhondareva Y.D., Trenkenshu R.P. 2019. Growth of *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara 1980 in the greenhouse pool under natural light and aeration. *Voprosy sovremennoi algologii [Issues of modern algology]* 3(21): 76–87. DOI: [10.33624/2311-0147-2019-3\(21\)-76-87](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-3(21)-76-87) (In Russian)

Zhu C., Hu C., Wang J. et al. 2023. A precise microalgae farming for CO<sub>2</sub> sequestration: a critical review and perspectives. *Science of the Total Environment* 901: 166013. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.166013](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166013)

NASA Langley Research Center (LaRC) POWER Project. 2026. URL: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/> Visited: May 28, 2026.

# Продукционные характеристики *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) в условиях естественного освещения при повышении обеспеченности углеродом

Оригинальная статья

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Авсиян А.Л.\*

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», проспект Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Для разработки устойчивых биотехнологий производства биомассы микроводорослей требуются оптимизация условий культивирования и оценка продуктивности при естественном освещении, учитывающие естественную динамику факторов среды. Целью данного исследования была оценка влияния углеродного обеспечения на продукционные характеристики, суточную динамику роста и ночную потерю биомассы при полупромышленном культивировании зелёной микроводоросли *Tetraselmis viridis* в условиях юга России (средние широты). Эксперимент проводили в накопительном режиме в открытых бассейнах при естественном солнечном освещении в весенний период. В контроле не использовалось дополнительного источника углерода, помимо атмосферного воздуха, а в опыте производилась подача  $\text{CO}_2$  в культуру с поддержанием pH до 8.5. Определяли биомассу, численность клеток, рассчитывали среднесуточную продуктивность, дневную продукцию, ночную потерю биомассы и КПД фотосинтеза. Показано, что в контрольном варианте накопительный рост был ограничен 8 сутками, максимальная среднесуточная продуктивность составила  $6.5 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ , общий урожай –  $43.5 \text{ г м}^{-2}$ , а рост лимитировался повышением pH до 10.5–10.8. Дополнительная подача  $\text{CO}_2$  увеличила продуктивность в 1.4 раза (до  $9.5 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ ), дневную продукцию – в 1.9 раза (до  $14.6 \text{ г м}^{-2}$ ), максимальную биомассу – до  $1.12 \text{ г л}^{-1}$ , а общий урожай – в 2.4 раза ( $103 \text{ г м}^{-2}$ ). При этом ночная потеря биомассы снизилась с 12.5 % до 9.5 % от вечерней биомассы, а КПД фотосинтеза повысился с 7.1 % до 12 % в среднем (до 17 % в отдельные дни). Показано, что в условиях обеспеченности углеродом ночная потеря биомассы положительно коррелирует с дневной продукцией. Также показано, что КПД фотосинтеза отрицательно коррелирует с суточной облучённостью. Таким образом, обеспечение культуры *T. viridis* углекислым газом не только устраняет углеродное лимитирование и способствует более длительному линейному росту, но и повышает эффективность использования солнечной энергии, снижая ночные потери. Полученные результаты могут служить основой для оптимизации технологий культивирования *T. viridis* в открытых системах с целью получения биомассы для аквакультуры, биотоплива и других биотехнологических применений.

**Ключевые слова:** микроводоросли, *Tetraselmis*, полупромышленное культивирование, продуктивность, углеродное обеспечение

Для цитирования: Авсиян А.Л. Продукционные характеристики *Tetraselmis viridis* (Chlorophyta) в условиях естественного освещения при повышении обеспеченности углеродом // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 4. - С. 505-522. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-4-505

## 1. Введение

В современной биоэкономике наблюдается устойчивая тенденция расширения применения микроводорослей и цианобактерий в области пищевой промышленности, сельского хозяйства и аквакультуры, фармации и производства диетических

добавок, биоремедиации и разработки биотоплива (López-Hernández et al., 2022). Микроводоросль *Tetraselmis viridis* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) благодаря быстрому росту и значительному содержанию липидов является перспективным объектом для альгобиотехнологии, а также рассматривается

\*Автор для переписки. Адрес e-mail: [anna\\_avs@ibss-ras.ru](mailto:anna_avs@ibss-ras.ru) (А.Л. Авсиян)

Поступила: 29 июня 2026;

Принята после доработки: 28 июля 2026;

Опубликована online: 28 августа 2026

© Автор(ы) 2026. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



в качестве потенциального объекта для биотоплива (Isdepsky and Borowitzka, 2019). Широкий диапазон устойчивости к солености и температуре представителей рода *Tetraselmis* способствует их применению в крупномасштабных биотехнологических производствах (Mehariya et al., 2024). Благодаря высокой нутритивной ценности, в том числе содержанию полиненасыщенных жирных кислот, *Tetraselmis* часто применяется в качестве кормового объекта в аквакультуре (Tulli et al., 2012), а также имеет перспективы для обогащения функциональных продуктов питания (Paterson et al., 2023).

Для устойчивого производства биомассы и ценных компонентов микроводорослей необходима разработка технологий культивирования, учитывающих: видовые особенности штамма (продуктивность, требования к факторам среды), систему культивирования (конструкцию фотобиореакторов, режим культивирования), климатические особенности места культивирования, в особенности суточную и сезонную динамику освещённости и температуры. Большинство биотехнологических производств микроводорослей и цианобактерий функционирует с использованием солнечной световой энергии с использованием открытых бассейнов или закрытых фотобиореакторов (Novoveská et al., 2023). Хотя при естественном освещении микроводоросли эффективно используют солнечную энергию, что существенно снижает эксплуатационные затраты по сравнению с искусственным освещением, в ночной фазе наблюдается потеря биомассы из-за темнового дыхания (Edmundson and Huesemann, 2015). Кроме того, на продуктивность культуры в полупромышленных условиях влияют изменчивые факторы среды (освещённость, температура), эффект масштабирования и обеспечение углеродным питанием, необходимым для фотосинтеза. Однако лабораторные условия не позволяют точно прогнозировать продуктивность штаммов в динамично меняющихся условиях открытых бассейнов, поэтому необходимы испытания в условиях естественного освещения и разработка режимов культивирования, учитывающих реальные суточные колебания света и температуры (Holdmann et al., 2019; Sarker and Kaparaju, 2023). Юг России, и в частности Крымский регион, обладает рядом преимуществ для биотехнологических производств микроводорослей при естественном освещении: достаточная продолжительность светового дня и количество солнечной энергии, мягкий климат, позволяющий получать урожай даже в осенние и весенние месяцы, близость источника морской воды для культивирования морских видов микроводорослей.

При достаточном уровне освещённости и обеспеченности элементами минерального питания недостаток источника углерода может приводить к ограничению продукционных характеристик. Повышение доступности углерода в среде достигается за счёт внесения газообразного  $\text{CO}_2$ , бикарбонатов в фотоавтотрофных культурах, либо в виде органических источников углерода (глюкоза, глицерин) в миксотрофных культурах микроводоро-

слей и цианобактерий (Agbebi et al., 2022; Zhu et al., 2023). Использование  $\text{CO}_2$  в качестве источника неорганического углерода при культивировании микроводорослей и цианобактерий позволяет не только устранить ограничение роста, связанное с недостатком углерода, но и осуществлять секвестрацию углекислого газа (Agbebi et al., 2022; Zhu et al., 2023). Эффективность секвестрации  $\text{CO}_2$  и продуктивность культур микроводорослей зависят от комплекса факторов, включающих как способ подачи углерода в систему культивирования (Zheng et al., 2018), так и конструкцию фотобиореактора, освещённость, температуру и физиологические характеристики используемого штамма микроводорослей (Zhu et al., 2023; Sarmah and Panda, 2026).

Исследования роста *T. viridis* в условиях открытых бассейнов при естественном освещении довольно малочисленны. Например, в работе (Жондарева и Тренкеншу, 2019) проводилось исследование роста в летний период, но без оценки суточной динамики продукционных характеристик. В то время как в работе (Gorbunova and Avsiyan, 2022) рассматривалась суточная динамика плотности культуры *T. viridis*, однако период исследования был ограничен тремя сутками.

Целью данной работы была оценка влияния углеродного обеспечения на продукционные характеристики *T. viridis* при полупромышленном культивировании на естественном освещении в условиях региона Севастополь, в том числе на суточную динамику ростовых характеристик в зависимости от естественных суточных циклов солнечного освещения.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Штамм микроводоросли и питательная среда

В качестве объекта исследования использовали альгологически чистую культуру зеленой одноклеточной микроводоросли *Tetraselmis viridis* (Roukhijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara 1980. Исследовали штамм IBSS-25 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБИОМ). Штамм IBSS-25 выделен из Черного моря в 1987 г. Для культивирования использовали питательную среду для морских микроводорослей по Тренкеншу и др. (1981) со следующим составом, г л<sup>-1</sup>:  $\text{NaNO}_3$  – 1.8;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.3;  $\text{EDTA-Na}_2$  – 0.037;  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 0.042;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.008;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  – 0.00625;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.00183;  $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 0.00238. Для приготовления питательной среды использовали искусственную морскую воду (Harrison et al., 1980). В качестве инокулята использовали культуру *T. viridis*, предварительно адаптированную к условиям культивирования при естественном освещении на протяжении пяти суток. Начальная плотность культуры по биомассе составляла 0.09 г л<sup>-1</sup>, а начальная численность клеток в культуре –  $4.31 \times 10^6$  кл мл<sup>-1</sup>.

## 2.2. Условия культивирования

Культивирование микроводорослей осуществляли в открытых бассейнах, расположенных в тепличном альгобиотехнологическом модуле ФИЦ ИнБЮМ, г. Севастополь (N. 44°61.564', E. 33°50.463') в весеннее время (последняя декада марта). В качестве фотобиореакторов использовали прямоугольные бассейны (1×1 м), выстеленные полиэтиленовой пленкой. Площадь поверхности бассейна составляла 1 м<sup>2</sup>, высота слоя культуры – 10 см, объем культуры – 100 л. Выращивание производилось в накопительном режиме в течение 12 суток. Высоту слоя и объем клеточной суспензии поддерживали постоянными, путём ежедневного добавления водопроводной воды перед отбором проб для компенсации испарения. Качество водопроводной воды соответствовало СанПиН 1.2.3685-21. Дополнительная стерилизация воды не проводилась.

Суспензия микроводорослей непрерывно перемешивалась с помощью электрических аквариумных насосов (Atman AT-202 (Chuangxing Electrical Appliances Co., Ltd, Китай) со скоростью 1200 л ч<sup>-1</sup>. Уровень освещённости определялся естественной величиной солнечной облучённости, с учетом 50% ослабления видимого света за счет прохождения через поликарбонатную теплицу. Продолжительность светового дня составляла от 12 до 12.5 ч. Температуру культуры микроводорослей поддерживали на уровне не ниже 23 °С с помощью аквариумного обогревателя Atman AT-50W (Atman, Китай). В контрольном варианте не проводилось дополнительного внесения источника углерода, источником CO<sub>2</sub> для роста служил атмосферный воздух. В эксперименте в качестве источника углеродного питания использовали CO<sub>2</sub>, подача которого контролировалась при помощи pH-контроллера Aqua Medic pH 2001 (Aqua Medic, Германия), уровень pH поддерживали на уровне от 6.8 до 8.5 единиц. При повышении pH культуры в бассейне выше 8.5 сигнал от датчика поступал на pH-контроллер, и включалась подача газообразного CO<sub>2</sub> в культуру через ПВХ-трубку, оканчивающуюся иглой с внутренним диаметром 0.5 мм. В каждом варианте было по две повторности.

## 2.3. Аналитические методы и расчёты

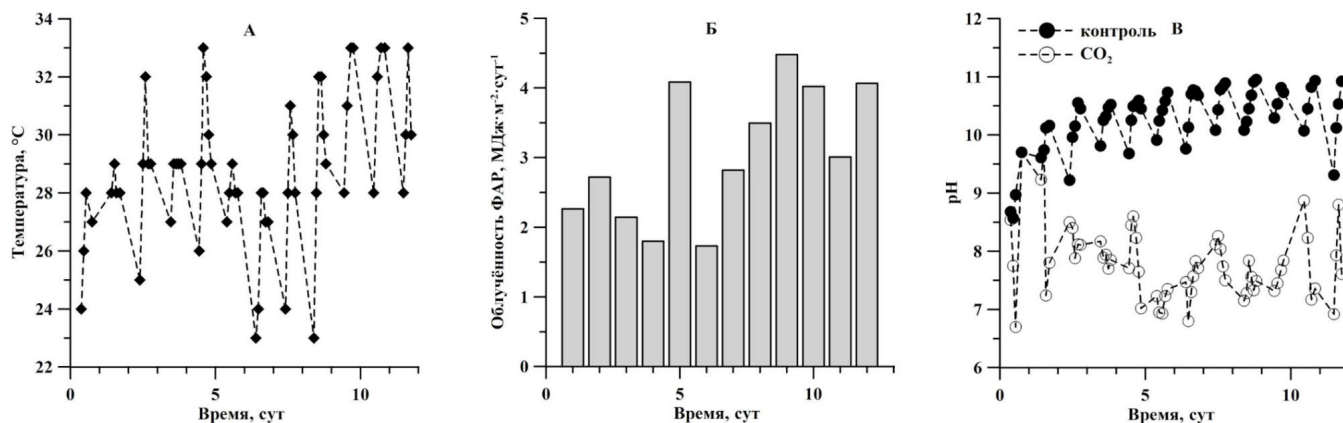
Отбор проб для определения плотности культуры, температуры и pH проводили пять раз в течение светового дня с 9:30 до 18:00 каждые 2–2.5 часа. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром, с абсолютной погрешностью измерений ± 0.5 °С, pH культуры измеряли с помощью pH-метра И-150 (ООО Измерительная техника, Россия). Величину суммарной суточной облучённости в области фотосинтетически активной радиации (ФАР) определяли на основе данных LARS NASA Power Project (<https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>) с учётом ослабления облучённости в поликарбонатной теплице. Использовался сотовый тепличный поликарбонат с УФ-фильтром толщиной 4 мм. Предварительно проведенное исследование показало, что облучённость в области фотосинтетически активной радиации в теплице снижалась на 50%. Динамика температуры культуры, поверхностной облучённости и pH клеточной суспензии в течение эксперимента представлена на Рис. 1.

Плотность культуры определяли фотометрическим методом. Оптическую плотность культуры измеряли в стеклянных кюветах с длиной светового пути 5 мм на длине волны 750 нм, используя фотометр Unico-2100 (UNICO (Shanghai) Instrument Co. Ltd, Китай). Для пересчета единиц оптической плотности ( $D_{750}$ , ед.опт.пл) в единицы сухого веса биомассы ( $B$ , г л<sup>-1</sup>) использовали предварительно определенный коэффициент  $k = 0.8$  г л<sup>-1</sup> ед.опт.пл<sup>-1</sup> (Боровков и Геворгиз, 2005):

$$B = k \cdot D_{750}.$$

Определение численности клеток ( $N$ , кл. мл<sup>-1</sup>) путём подсчёта в камере Горяева (Минимед, Россия) под световым микроскопом Carl Zeiss AxioStar Plus (Carl Zeiss, Германия) осуществляли один раз в сутки. Одновременно с этим, при световой микроскопии проводилась оценка чистоты культуры и отсутствия контаминации посторонними микроводорослями или простейшими.

Максимальную среднесуточную продуктивность ( $P_m$ ) рассчитывали путём аппроксимации кривой роста по биомассе на линейной стадии роста:



**Рис.1.** Условия культивирования: температура клеточной суспензии (А), солнечная облучённость поверхности культуры в области ФАР (Б) и pH клеточной суспензии (В) в течение полупромышленного роста культуры *T. viridis*. CO<sub>2</sub> – вариант с дополнительным внесением углекислого газа.

$$B = B_l + P_m \times (t - t_l),$$

где  $B_l$  – плотность культуры на линейной стадии роста;  $t_l$  – время в начале линейной стадии роста (Лелеков и Тренкеншу, 2007).

Удельную скорость роста по биомассе ( $\mu_B$ ) рассчитывали следующим образом:

$$\mu_B = (\ln(B_2) - \ln(B_1)) / t,$$

где  $B_2$  – конечная биомасса,  $B_1$  – начальная биомасса,  $t$  – время.

Удельную скорость роста по численности клеток ( $\mu_N$ ) рассчитывали как:

$$\mu_N = (\ln(N_2) - \ln(N_1)) / t,$$

где  $N_2$  – конечная численность,  $N_1$  – начальная численность,  $t$  – время.

Общую ночную потерю биомассы (НПБ) как долю от биомассы в конце светового периода ( $NBL_B$ ) рассчитывали, используя следующее выражение:

$$NBL_B = ((B_L' - B_D) / B_L) \cdot 100\%;$$

НПБ как доля от продукции за предыдущий световой период рассчитывали, используя следующее выражение:

$$NBL_p = ((B_L' - B_D) / (B_L' - B_D')) \cdot 100\%,$$

где  $B_L'$  – плотность культуры в конце предыдущего светового периода,  $B_D$  – плотность культуры в конце темнового периода,  $B_D'$  – плотность культуры в конце предыдущего темнового периода (Qiang et al., 1996).

Дневную продукцию определяли как разность плотности культуры в конце и в начале светового дня. Пересчёт продукционных параметров культуры (плотность, продуктивность) на единицу площади проводили с учётом соотношения 100 л  $m^{-2}$  при глубине слоя культуры 10 см.

Величину КПД фотосинтеза рассчитывали, как отношение запасённой энергии (произведение дневной продукции на единицу площади ( $г\ m^{-2}\ сут^{-1}$ ) и калорийности биомассы) к поглощенной солнечной энергии ФАР в расчёте на единицу площади ( $кДж\ м^{-2}\ сут^{-1}$ ), учитывая то, что в плотной культуре вся падающая световая энергия поглощалась. Калорийность биомассы *T. viridis* считали равной 24.2  $кДж\ г^{-1}$  (Chini Zittelli et al., 2006).

## 2.4. Статистический анализ

Статистический анализ экспериментальных данных выполнялись с использованием программного обеспечения Grapher3 (Golden Software) и Microsoft Excel (Microsoft Office). Рассчитывали среднее арифметическое ( $\bar{x}$ ), стандартное отклонение (SD), ошибку среднего, доверительные интервалы (ДИ) для среднего ( $\Delta\bar{x}$ ). Достоверность различий между выборками оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ . Для корреляционного анализа вычисляли коэффициенты корреляции Спирмена ( $r$ ). Все расчеты выполняли для уровня значимости  $\alpha = 0.05$ .

## 3. Результаты

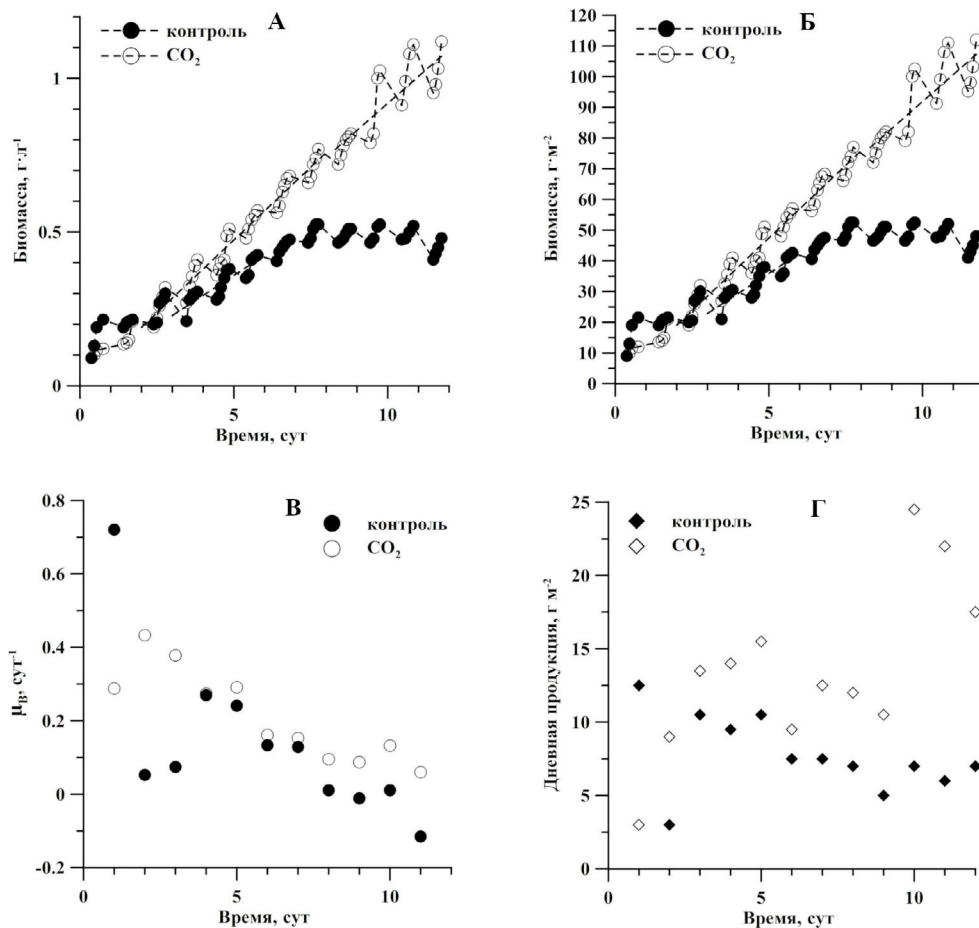
Оценка параметров роста культуры *T. viridis* при естественном освещении проводилась в бассей-

нах открытого типа, приближённых по конструкции к промышленным системам. Открытые бассейны располагались в теплице для частичного контроля температурного режима и защиты от атмосферных осадков и загрязнений. Микроскопический контроль чистоты культуры подтвердил отсутствие контаминации другими видами микроводорослей или простейшими в течение всего периода культивирования. Выращивание культуры микроводорослей проводилось в весеннее время, при фотопериоде близком к 12 ч (весеннее равноденствие). Суммарная суточная облучённость в области ФАР в это время года составляла от 2 до 4  $МДж\ м^{-2}\ сут^{-1}$  (Рис. 1Б).

Эксперимент проводился в накопительном режиме, его продолжительность составила 12 суток. Окончание эксперимента было обусловлено началом стадии отмирания в контрольном варианте. Накопительные кривые по концентрации биомассы в культуре (сухой вес) представлены на Рис. 2А. Поскольку для полупромышленных систем важным параметром является концентрация биомассы и продуктивность относительно площади занимаемой поверхности, дополнительно рассчитывали концентрацию биомассы на площадь поверхности фотобиореактора (Рис. 2Б).

В контрольном варианте без дополнительного внесения  $CO_2$  стадия линейного роста культуры *T. viridis* по биомассе наблюдалась с 4-х по 6-е сутки. Максимальная среднесуточная продуктивность по биомассе ( $P_m$ ) составила 0.065  $г\ л^{-1}\ сут^{-1}$  или 6.5  $г\ м^{-2}\ сут^{-1}$ . После 8-х суток наступала стационарная стадия, а к 12-м суткам начиналась стадия отмирания. Максимальная удельная скорость роста по биомассе ( $\mu_B$ ) была отмечена на 1-е сутки культивирования (0.72  $сут^{-1}$ ), а к 8-м суткам снижалась до 0.01  $сут^{-1}$  и в дальнейшем была близкой к нулю или отрицательной (Рис. 2В). Максимальная биомасса достигала 0.525  $г\ л^{-1}$  (или 52.5  $г\ м^{-2}$  в расчёте на площадь поверхности), что соответствовало общему урожаю 43.5  $г\ м^{-2}$  биомассы за всё время культивирования. Стоит отметить, что после 8-х суток накопления биомассы не происходило. Стоит отметить, что при отсутствии внесения  $CO_2$  уровень pH в течение накопительного культивирования *T. viridis* возрастал. После 3-х суток эксперимента уровень pH в конце светового дня достигал значения 10.5–10.8, а в течение ночи снижался до 9.7–10 (Рис. 1 В).

В варианте с дополнительным внесением  $CO_2$  в 1-е сутки эксперимента наблюдалась лаг-фаза, во время которой происходила адаптация культуры к повышенному содержанию углерода. До окончания эксперимента рост культуры был линейным, причём можно было выделить два участка линейного роста: с 3-х по 8-е сутки, со среднесуточной продуктивностью 0.095  $г\ л^{-1}\ сут^{-1}$  (9.5  $г\ м^{-2}\ сут^{-1}$ ) и с 9 по 12 сутки, со среднесуточной продуктивностью 0.088  $г\ л^{-1}\ сут^{-1}$  (8.8  $г\ м^{-2}\ сут^{-1}$ ). В среднем, продуктивность *T. viridis* при внесении  $CO_2$  была в 1.4 раза выше, чем в контрольном варианте опыта. Максимальная удельная скорость роста по биомассе ( $\mu_B$ ) 0.43  $сут^{-1}$  наблюдалась на 2-е сутки эксперимента, после чего экспоненциально снижалась до 0.06  $сут^{-1}$  на 11 сутки.

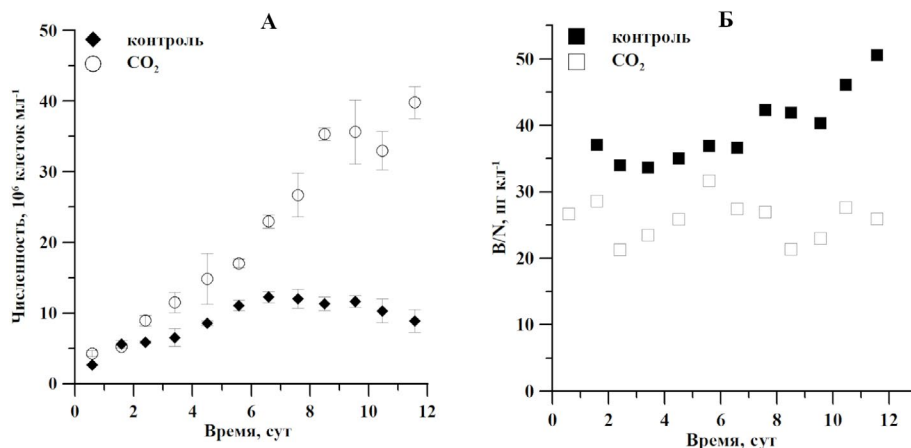


**Рис.2.** Динамика концентрации биомассы относительно объема (А) и площади поверхности (Б), удельной скорости роста (В) и дневной продукции (Г) при накопительном культивировании *T. viridis* при естественном освещении с различным углеродным обеспечением.  $\text{CO}_2$  – вариант с дополнительным внесением углекислого газа.

Максимальная биомасса при дополнительном обеспечении углеродом составила 1.12  $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$  (112  $\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$  в расчёте на площадь поверхности). Таким образом, за всё время культивирования общий урожай составил 103  $\text{г} \cdot \text{м}^{-2}$ , что в 2.4 раза превысило общий урожай в варианте без дополнительного снабжения неорганическим углеродом.

Помимо определения плотности культуры по биомассе, оценивали динамику численности клеток в культуре (Рис. 3А) и соотношение биомассы к численности ( $B/N$ ), опосредованно отражающее средний размер клеток (Рис. 3Б). Линейный рост чис-

ленности клеток *T. viridis* в контрольном варианте происходил с 4-х по 6-е сутки, аналогично линейной стадии роста по биомассе. Максимальная численность клеток в контрольном варианте составила  $12.27 \times 10^6$  клеток  $\text{мл}^{-1}$ . Удельная скорость роста по численности клеток ( $\mu_N$ ) при этом была отмечена в первые сутки эксперимента (0.74  $\text{сут}^{-1}$ ), после чего резко снижалась, после 7-х суток становясь нулевой либо отрицательной. Наряду с этим после 7-х суток отмечено возрастание соотношения  $B/N$  от 36.6 до 50.5  $\text{пг} \cdot \text{кл}^{-1}$ , что свидетельствует об укрупнении клеток в культуре.



**Рис.3.** Динамика численности клеток (А) и соотношения биомассы к численности клеток ( $B/N$ ) (Б) при накопительном культивировании *T. viridis* при естественном освещении с различным углеродным обеспечением.  $\text{CO}_2$  – вариант с дополнительным внесением углекислого газа.

При внесении  $\text{CO}_2$  рост численности клеток микроводорослей был более активным, чем в контроле. Максимальная численность составила  $39.8 \times 10^6$  клеток·мл<sup>-1</sup>, что было выше, чем в контрольном варианте в 3.2 раза. Максимальная удельная скорость роста ( $\mu_N$ ) 0.53 сут<sup>-1</sup> была отмечена на 2-е сутки эксперимента, аналогично скорости роста по биомассе. Соотношение биомассы к численности  $B/N$  оставалось более стабильным, чем в контроле, составляя от 24 до 31 пг кл<sup>-1</sup>. Также, в период активного роста соотношение  $B/N$  при внесении  $\text{CO}_2$  было в среднем в 1.4 раза ниже, чем в контроле.

На основании динамики плотности культуры в течение суток вычисляли дневную продукцию (Рис. 2Г) и ночную потерю биомассы в культуре *T. viridis*. В контрольном варианте дневная продукция на линейной стадии роста (4-е – 6-е сутки) была 10.2 г м<sup>-2</sup>, а в среднем за период накопительного культивирования составила 7.75 г м<sup>-2</sup>. При дополнительном внесении  $\text{CO}_2$  дневная продукция была значительно выше (14.6 г м<sup>-2</sup>). При дополнительном углеродном обеспечении наблюдалась положительная корреляция дневной продукции и суммарной суточной облучённости ( $r=0.42$ ), в то время как в контрольном варианте такой корреляции не было обнаружено. В обоих вариантах опыта накопление биомассы в культуре продолжалось на протяжении всего светового дня, а наибольший почасовой прирост биомассы наблюдался в середине светового дня (12:00 – 14:00).

Ночная потеря биомассы (от биомассы в конце светового дня,  $NBL_B$ ) в контроле в среднем составила 12.5% от биомассы, а при внесении  $\text{CO}_2$  была ниже, составляя в среднем 9.5% от биомассы (Рис. 4А). При этом для обоих вариантов опыта наибольшие значения  $NBL_B$  отмечены в начале накопительного культивирования и к окончанию эксперимента, в то время как минимальные значения  $NBL_B$  наблюдались на 5-е – 8-е сутки эксперимента. Для варианта с внесением  $\text{CO}_2$  выявлена достоверная корреляция  $NBL_B$  и дневной продукции ( $r=0.55$ ), в то время как для контрольного варианта корреляция была положительной, но не достоверной ( $r=0.23$ ).

Ночная потеря биомассы как доля от продукции ( $NBL_p$ ) до 7-х суток была в пределах от 20 до

40% от дневной продукции, после чего значительно возрастала, и в варианте без дополнительного углеродного обеспечения  $NBL_B$  могла достигать 100% и даже превышать дневную продукцию (Рис. 4Б).

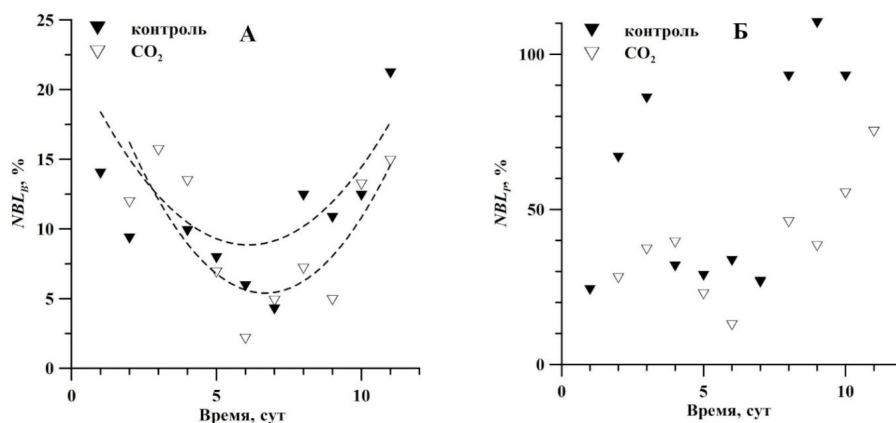
Для оценки эффективности утилизации солнечной энергии культурой *T. viridis* был выполнен расчёт КПД фотосинтеза. В обоих вариантах опыта выявлена отрицательная корреляция КПД от суммарной облучённости,  $r=-0.79$  и  $r=-0.41$  в контроле и с внесением  $\text{CO}_2$ , соответственно. То есть при повышении интенсивности инсоляции снижалась эффективность её конверсии в биомассу (Рис. 5). Поскольку при внесении  $\text{CO}_2$  в культуру дневная продукция и скорость роста в 1-е сутки были атипично низкими и выделялись из общего тренда (Рис. 2В, Рис. 2Г), значение КПД в 1-е сутки (3.2%) было исключено из расчёта зависимости от облучённости.

Внесение  $\text{CO}_2$  в культуру способствовало повышению КПД фотосинтеза. В контрольном варианте КПД составлял от 2.7 до 12.8% (в среднем, 7.1%), в то время как при обеспечении  $\text{CO}_2$  КПД был выше, составляя 3.2 до 17.7% (в среднем, 12%).

#### 4. Обсуждение

Экспериментальное культивирование *T. viridis* в полупромышленных масштабах позволило как оценить производственные характеристики этого вида в условиях естественных суточных циклов освещения, так и выявить влияние наличия источника неорганического углерода на рост культуры и накопление биомассы.

При полупромышленном культивировании *T. viridis* в условиях естественного солнечного освещения было продемонстрировано, что снабжение культуры микроводорослей углеродом путем подачи  $\text{CO}_2$  в среду приводило к значительному повышению производственных характеристик. Так, максимальная среднесуточная продуктивность на линейной стадии роста  $P_m$  возрастала в 1.46 раза и достигала 9.5 г м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>, а дневная продукция увеличивалась в 1.9 раза, достигая 14.6 г м<sup>-2</sup>. Также, в контрольном варианте без дополнительного углеродного обеспечения накопительный рост культуры



**Рис.4.** Ночная потеря биомассы как доля от биомассы (А) и как доля от дневной продукции (Б) в культуре *T. viridis* при естественном освещении с различным углеродным обеспечением. Прерывистая линия – линия тренда.  $\text{CO}_2$  – вариант с дополнительным внесением углекислого газа.

микроводорослей продолжался 8 суток, после чего прекращался, по-видимому, из-за лимитирования по углероду. Благодаря более длительному периоду роста и большей продуктивности максимальная плотность культуры при снабжении  $\text{CO}_2$  достигла  $1.12 \text{ г л}^{-1}$ , а общий урожай биомассы за время культивирования ( $103 \text{ г м}^{-2}$ ) в 2.4 раза превысил значение для контрольного варианта.

В дополнение к атмосферному воздуху, углеродное обеспечение в культурах микроводорослей может осуществляться в неорганической форме (углекислый газ или бикарбонат натрия) или в форме органических веществ (Agbebi et al., 2022). Снабжение источником неорганического углерода в виде  $\text{CO}_2$  в плотных культурах микроводорослей не только повышает концентрацию неорганического углерода в среде, но и способствует поддержанию оптимальной pH среды (Moheimani, 2013a). В плотных культурах микроводорослей и цианобактерий потребление  $\text{CO}_2$  в процессе фотосинтеза приводит к увеличению уровня pH, что в свою очередь сдвигает равновесие в карбонатной системе в сторону карбонатов ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), формы углерода, недоступной для клеток водорослей (Shiraiwa et al., 1993). Также, для потребления гидрокарбонатов клетками требуется дополнительный расход энергии для работы карбоангидраз (Moheimani, 2013a). В данном исследовании было отмечено, что уровень pH при отсутствии внесения  $\text{CO}_2$  возрастал как в течение накопительного культивирования, так и в течение светового дня. В ночной период pH снижался за счет темнового дыхания и выделения  $\text{CO}_2$  в среду клетками микроводорослей. Сходный тренд суточной динамики pH наблюдался в культурах *Tetraselmis suecica* и *Chlorella* sp. (Moheimani, 2013a). Вероятно, именно повышение pH выше оптимального уровня лимитировало потребление углерода и значительно ограничило общий урожай биомассы в контрольном варианте в текущем исследовании. Дополнительным фактором, отрицательно влияющим на рост водорослей при повышенном уровне pH является возможное выпадение в осадок солей кальция, магния, фосфора и микроэлементов. Способность к росту при  $\text{pH} > 10$  у промышленно значимых видов микроводорослей, таких как *Chlorella*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Tetraselmis*, и цианобактерий (*Limnospira*) может объясняться как меньшей потребностью в микроэлементах, так и выделением в среду хелатирующих соединений, препятствующих осаждению микроэлементов (Goldman et al., 1982; Thomas et al., 2026). Тем не менее, повышение уровня pH может способствовать накоплению липидов за счёт изменения метаболизма клеток, ускорять поглощение  $\text{CO}_2$  из атмосферного воздуха, а также препятствовать контаминации культуры бактериями и простейшими (Shiraiwa et al., 1993; Thomas et al., 2026).

Поскольку система культивирования была приближена к открытым бассейнам, использующимся при промышленном выращивании микроводорослей, для приготовления среды и для компенсации испарения использовалась водопроводная вода. Согласно нормативам, в водопроводной питье-

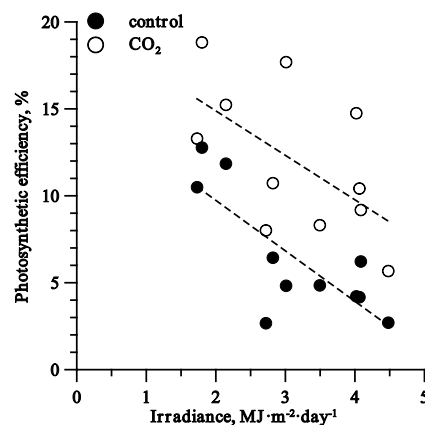


Рис.5. Зависимость КПД фотосинтеза в культуре *T. viridis* от суммарной суточной облучённости при естественном освещении с различным углеродным обеспечением. Прерывистые линии – линейные аппроксимации.  $\text{CO}_2$  – вариант с дополнительным внесением углекислого газа.

вой воде могут содержаться гидрокарбонаты в концентрации до  $400 \text{ мг л}^{-1}$ . Согласно отчету (<https://sevvodokanal.org.ru/pages/kachestvo>) жесткость воды составляла  $3.7 \pm 0.6$  °Ж, что примерно соответствует концентрации гидрокарбонатов  $226 \text{ мг л}^{-1}$ . В исследованиях роста микроводорослей обычно используются концентрации гидрокарбонатов от  $0.2$  до  $5 \text{ г л}^{-1}$  и выше, а концентрации ниже  $0.5 \text{ г л}^{-1}$  не оказывают достоверного влияния на скорость роста (Borovkov et al., 2026). Таким образом, концентрация гидрокарбонатов в водопроводной воде не была достаточно высокой для оказания влияния на углеродное обеспечение культуры микроводорослей.

В более ранних исследованиях роста *T. viridis* в открытых бассейнах приводятся значения средне-суточной продуктивности от  $4.2$  до  $14.4 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$  (Жондарева и Тренкеншу, 2019; Gorbunova and Avsiyan, 2022). Однако, более высокие значения максимальной продуктивности при этом наблюдались в летнее время, при большей солнечной облучённости. Также, линейная стадия была непродолжительной, и максимальная биомасса составила  $49 \text{ г м}^{-2}$ , что сопоставимо с максимальной биомассой в контрольном варианте и значительно ниже максимальной биомассы, достигнутой при добавлении  $\text{CO}_2$ .

Также, продукционные характеристики *T. viridis* в текущем исследовании сходны с продуктивностью других видов рода *Tetraselmis* в условиях естественного освещения. В открытых бассейнах типа рэйсвей продуктивность *Tetraselmis suecica* составляла  $48\text{--}92 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$ , что при глубине рабочего слоя  $20 \text{ см}$  соответствовало продуктивности на единицу площади от  $9.6$  до  $18.4 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$  (Cuello et al., 2015). *Tetraselmis* sp. при выращивании в бассейнах типа рэйсвей в осеннее время в Австралии демонстрировал продуктивность  $36 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  (или  $7.2 \text{ г м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$ ) без добавления  $\text{CO}_2$ , что очень сходно с показателями, полученными нами в контрольном варианте без дополнительного углеродного обеспечения (Raes et al., 2014). Продуктивность *T. suecica* в фотобиореакторах мешочного типа в Австралии составляла около  $110 \text{ мг л}^{-1} \text{ сут}^{-1}$  (Moheimani,

2013b). Chini Zitelli et al. (2006) сообщалось, что продуктивность культуры *T. suecica* при выращивании в Италии в августе достигала 36-38 г м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>. Но этот показатель был достигнут при культивировании в вертикальных трубчатых фотобиореакторах при большем уровне освещённости.

Продуктивность культур микроводорослей при естественном освещении определяется как условиями минерального и углеродного обеспечения, так и климатическими факторами места культивирования. Наиболее важным фактором среды является облучённость культуры в области фотосинтетически активной радиации. Настоящее исследование роста *T. viridis* проводилось в весеннее время в условиях средних широт, и средняя суточная облучённость в области ФАР составляла 3 МДж м<sup>-2</sup> сут<sup>-1</sup>. Положительная корреляция дневной продукции и суточной облучённости при добавлении CO<sub>2</sub> позволяет предположить, что дополнительное углеродное обеспечение при более высокой облучённости будет способствовать достижению больших продукционных показателей для этого вида микроводорослей.

При дополнительном внесении источника углерода в культуру *T. viridis* возрастала численность клеток, скорость деления и был отмечен более низкий показатель соотношения *B/N*, свидетельствующий о меньшем среднем размере клеток. Снижение скорости деления и укрупнение клеток в контрольном варианте могут быть обусловлены неблагоприятными условиями, ограничивающими деление клеток, из-за недостатка углеродного субстрата, а также высокого уровня pH.

Рост культуры *T. viridis* наблюдался в течение всего светового дня, однако даже в условиях максимальной продуктивности ночная потеря биомассы составляла от 20 до 40% от дневной продукции. Учитывая это, целесообразно проводить сбор урожая в вечернее время для снижения потерь.

Ночная потеря биомассы в культурах микроводорослей зачастую возрастает при увеличении скорости роста за счёт увеличения дыхания роста. Например, была показана линейная зависимость между суточным урожаем (продуктивностью) и ночной потерей биомассы для культуры *Tetraselmis suecica* (Michels et al., 2014). Однако в данном исследовании было показано, что для *T. viridis* внесение источника углерода как повышало дневную и среднесуточную продукцию, так и приводило к снижению ночной потери биомассы. Для *Limnospira platensis* сходным образом было показано, что при снижении концентрации источника неорганического углерода (в форме бикарбоната натрия) происходило увеличение ночной потери биомассы (Авсиян и Геворгиз, 2025). Вероятно, лимитирование роста культуры по углероду требует дополнительных энергетических затрат, в частности, для работы CO<sub>2</sub>-концентрирующих механизмов.

При внесении CO<sub>2</sub> повышалась эффективность утилизации солнечной энергии культурой микроводорослей, КПД конверсии в биомассу составил до 17% (12% в среднем), что является достаточно высоким значением. Для сравнения, рост культуры

*Tetraselmis suecica* в трубчатых фотобиореакторах позволял достигать КПД 9.4% (Chini Zitelli et al., 2006).

В целом, в результате исследования был достигнут устойчивый рост культуры *T. viridis* в открытых бассейнах в весеннее время в условиях климата средних широт. Установлено влияние углеродного обеспечения в виде подачи CO<sub>2</sub> на продукционные характеристики микроводоросли при естественном солнечном освещении, что позволяет повысить производительность систем культивирования, а также открывает перспективы одновременной секвестрации углекислого газа и продукции биомассы для аквакультуры, биотоплива и других биотехнологических применений. Предметом дальнейших исследований может быть оценка влияния углеродного обеспечения на продуктивность *T. viridis* по отдельным компонентам биомассы, таким как липиды и пигменты, а также проведение техно-экономического анализа, сопоставляющего дополнительные операционные затраты и стоимость биомассы для крупномасштабных систем культивирования.

## 5. Выводы

Исследование роста *T. viridis* при полупромышленном культивировании в условиях климата средних широт показало, что дополнительное углеродное обеспечение способствует увеличению продуктивности и максимальной биомассы и обеспечивает повышение эффективности утилизации солнечной энергии. Для дальнейшей оптимизации функционирования биотехнологических производств по выращиванию *T. viridis* необходимо проведение более подробного техно-экономического анализа, учитывающего затраты как на углекислый газ, так и на капитальные расходы на конкретную систему внесения CO<sub>2</sub> в культуру микроводорослей.

## Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№ гос. регистрации 124022400152-1).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

Авсиян А.Л., Геворгиз Р.Г. 2025. Влияние углеродного и светового обеспечения на продуктивность и ночную потерю биомассы *Limnospira (Spirulina) platensis* в условиях естественного освещения. В: Балтийский морской форум: Материалы XIII Международного Балтийского морского форума: в 6 томах. Том 3. Водные биоресурсы, аквакультура и экология водоемов, С. 5–11.

- Боровков А.Б., Геворгиз Р.Г. 2005. Продуктивность *Spirulina platensis* и *Tetraselmis viridis* при использовании различных методов культивирования. Экология моря 70: 9–13.
- Жондарева Я.Д., Тренкеншу Р.П. 2019. Рост *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen) R.E.Norris, Hori & Chihara 1980 в тепличном бассейне при естественном освещении и аэрации воздухом. Вопросы современной альгологии 3 (21): 76–87. DOI: [10.33624/2311-0147-2019-3\(21\)-76-87](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2019-3(21)-76-87)
- Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. 2007. Простейшие модели роста микроводорослей. 4. Экспоненциальная и линейная фазы роста. Экология моря 74: 47–49.
- Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. 1981. Плотные культуры морских микроводорослей. Известия СО АН СССР. Серия Биологическая 15(3): 75–82.
- Agbebi T.V., Ojo E.O., Watson I.A. 2022. Towards optimal inorganic carbon delivery to microalgae culture. Algal Research 67:102841. DOI: [10.1016/j.algal.2022.102841](https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102841)
- Borovkov A.B., Rylkova O.A., Gudvilovich I.N. et al. 2026. Growth and morphometric characteristics of the microalga *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross using sodium bicarbonate as a carbon source. Bioresource Technology Reports 33:102615. DOI: [10.1016/j.biteb.2026.102615](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2026.102615)
- Chini Zittelli C., Rodolfi L., Biondi N. et al. 2006. Productivity and photosynthetic efficiency of outdoor cultures of *Tetraselmis suecica* in annular columns. Aquaculture 261(3): 932–943. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2006.08.011](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.011)
- Cuello M.C., Cosgrove J.J., Randhir A. et al. 2015. Comparison of continuous and day time only mixing on *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta) in outdoor raceway ponds. Journal of applied phycology 27(5): 1783-1791. DOI: [10.1007/s10811-014-0420-5](https://doi.org/10.1007/s10811-014-0420-5)
- Edmundson S.J., Huesemann M.H. 2015. The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis salina* and *Picochlorum* sp. Algal research 12: 470–476. DOI: [10.1016/j.algal.2015.10.012](https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.012)
- Goldman J.C., Azov Y., Riley C.B. et al. 1982. The effect of pH in intensive microalgal cultures. I. Biomass regulation. Journal of experimental marine biology and ecology 57(1): 1–13. DOI: [10.1016/0022-0981\(82\)90140-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90140-X)
- Gorbunova S.Y., Avsiyan A.L. 2022. Diurnal dynamics of green microalga *Tetraselmis viridis* culture density in open pond monitored by optical density sensor. Bioresource Technology Reports 20: 101251. DOI: [10.1016/j.biteb.2022.101251](https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101251)
- Harrison P.J., Waters R.E., Taylor F.J.R. 1980. A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. Journal of Phycology 16: 28–35. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1980.00028.x)
- Holdmann C., Schmid-Staiger U., Hirth T. 2019. Outdoor microalgae cultivation at different biomass concentrations—assessment of different daily and seasonal light scenarios by modeling. Algal Research 38: 101405. DOI: [10.1016/j.algal.2018.101405](https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101405)
- Isdepsky A., Borowitzka M.A. 2019. In-pond strain selection of euryhaline *Tetraselmis* sp. strains for reliable long-term outdoor culture as potential sources of biofuel and other products. Journal of Applied Phycology 31(6): 3359–3370. DOI: [10.1007/s10811-019-01873-y](https://doi.org/10.1007/s10811-019-01873-y)
- López-Hernández J.F., Kean-Meng T., Asencio-Alcudia G.G. et al. 2022. Sustainable microalgae and cyanobacteria biotechnology. Applied Sciences 12(14): 6887. DOI: [10.3390/app12146887](https://doi.org/10.3390/app12146887)
- Mehariya S., Annamalai S.N., Thaher M.I. et al. 2024. A comprehensive review on versatile microalga *Tetraselmis*: Potentials applications in wastewater remediation and bulk chemical production. Journal of Environmental Management 365: 121520. DOI: [10.1016/j.jenvman.2024.121520](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121520)
- Michels M.H.A., Slegers P.M., Vermuë M.H. et al. 2014. Effect of biomass concentration on the productivity of *Tetraselmis suecica* in a pilot-scale tubular photobioreactor using natural sunlight. Algal Research 4: 12–18. DOI: [10.1016/j.algal.2013.11.011](https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.011)
- Moheimani N.R. 2013. Inorganic carbon and pH effect on growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) grown outdoors in bag photobioreactors. Journal of applied phycology 25(2): 387–398. DOI: [10.1007/s10811-012-9873-6](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9873-6)
- Moheimani N.R. 2013. Long-term outdoor growth and lipid productivity of *Tetraselmis suecica*, *Dunaliella tertiolecta* and *Chlorella* sp (Chlorophyta) in bag photobioreactors. Journal of Applied Phycology 25(1): 167–176. DOI: [10.1007/s10811-012-9850-0](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9850-0)
- Novoveská L., Nielsen S.L., Eroldogan O.T. et al. 2023. Overview and challenges of large-scale cultivation of photosynthetic microalgae and cyanobacteria. Marine drugs 21(8): 445. DOI: [10.3390/md21080445](https://doi.org/10.3390/md21080445)
- Paterson S., Gómez-Cortés P., de la Fuente M.A. et al. 2023. Bioactivity and digestibility of microalgae *Tetraselmis* sp. and *Nannochloropsis* sp. as basis of their potential as novel functional foods. Nutrients 15(2): 477. DOI: [10.3390/nu15020477](https://doi.org/10.3390/nu15020477)
- Qiang H., Guterman H., Richmond A. 1996. Physiological characteristics of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria) cultured at ultrahigh cell densities. Journal of Phycology 32(6): 1066–1073. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1996.01066.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.01066.x)
- Raes E.J., Isdepsky A., Muylaert K. et al. 2014. Comparison of growth of *Tetraselmis* in a tubular photobioreactor (Biocoil) and a raceway pond. Journal of Applied Phycology 26(1): 247–255. DOI: [10.1007/s10811-013-0077-5](https://doi.org/10.1007/s10811-013-0077-5)
- Sarker N.K., Kaparaju P. 2023. A critical review on the status and progress of microalgae cultivation in outdoor photobioreactors conducted over 35 years (1986–2021). Energies 16(7): 3105. DOI: [10.3390/en16073105](https://doi.org/10.3390/en16073105)
- Sarmah M., Panda M.R. 2026. Systematic review on proliferation of microalgae and carbon sequestration potential for sustainability. World Journal of Microbiology and Biotechnology 42(3): 100. DOI: [10.1007/s11274-026-04849-6](https://doi.org/10.1007/s11274-026-04849-6)
- Shiraiwa Y., Goyal A., Tolbert N.E. 1993. Alkalization of the medium by unicellular green algae during uptake dissolved inorganic carbon. Plant and cell physiology 34(5): 649–657. DOI: [10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078467)
- Thomas P.K., Gerlach R., Narwani A. 2026. Hunting for Extremophiles: A Systematic Screening of Freshwater Microalgae for Tolerance to High-pH and High-Alkalinity Cultivation. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 14(9): 4376–4386. DOI: [10.1021/acssuschemeng.5c09906](https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5c09906)
- Tulli F., Chini Zittelli G., Giorgi G. et al. 2012. Effect of the inclusion of dried *Tetraselmis suecica* on growth, feed utilization, and fillet composition of European sea bass juveniles fed organic diets. Journal of aquatic food product technology 21(3): 188–197. DOI: [10.1080/10498850.2012.664803](https://doi.org/10.1080/10498850.2012.664803)
- Zheng Q., Xu X., Martin G.J. et al. 2018. Critical review of strategies for CO<sub>2</sub> delivery to large-scale microalgae cultures. Chinese journal of chemical engineering 26(11): 2219–2228. DOI: [10.1016/j.cjche.2018.07.013](https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.07.013)
- Zhu C., Hu C., Wang J. et al. 2023. A precise microalgae farming for CO<sub>2</sub> sequestration: a critical review and perspectives. Science of the Total Environment 901: 166013. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2023.166013](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166013)
- NASA Langley Research Center (LaRC) POWER Project. 2026. URL: <https://power.larc.nasa.gov/data-access-viewer/>  
Дата посещения: 28 мая 2026.