



VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos

II kurso studentė

Kamilė Jonynaitė

***Chlorella vulgaris* dumblių ir *Delftia* sp. bakterijų tarpusavio  
santykiai ir jų pokyčiai impulsinio elektrinio lauko poveikyje.**

Magistro darbas

Darbo vadovas:  
dr. Arūnas Stirė

Vilnius

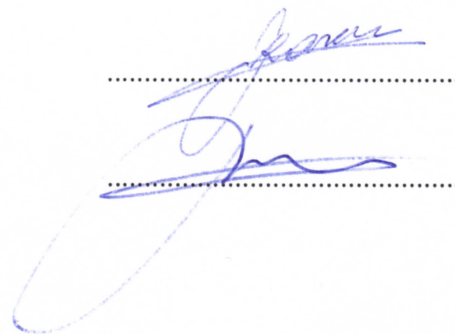
2020

*Chlorella vulgaris* dumblių ir jų buveinėje dominuojančių bakterijų tarpusavio  
santykių pokyčiai, impulsinio elektrinio lauko poveikyje

Darbas atliktas Fizinių ir technologinių mokslų centre, Bioelektrinių reiškinių  
laboratorijoje.

Darbą atliko: Kamilė Jonynaitė

Darbo vadovas: dr. Arūnas Stirkė

Two handwritten signatures in blue ink are positioned on dotted lines. The top signature is smaller and more compact, while the bottom signature is larger and more stylized, with a prominent loop at the end.

## TURINYS

Santrumpų sąrašas .....	5
Įvadas .....	6
1. Literatūros apžvalga .....	8
1.1. Mikrodumbliai – naujausias biotechnologijų pramonės objektas.....	8
1.2. Mikrodumblių kultivavimas .....	13
1.3. Mikrodumblių ir jų aplinkoje dominuojančių mikroorganizmų tarpusavio sąveika.....	16
1.4. Impulsinis elektrinis laukas ir jo poveikio pritaikymas .....	21
1.5. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	24
2. tyrimų medžiagos ir metodika .....	27
2.1. Mikrodumblių kultivavimas .....	27
2.2. Bakterijų kultivavimas.....	27
2.3. Bakterijų identifikavimas.....	27
2.4. Mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimų metodika .....	28
2.4.1. Dumblių optinio tankio vertinimas .....	28
2.4.2. Dumblių drumstumo nustatymas .....	29
2.4.3. Chlorofilo <i>a</i> koncentracijos nustatymas.....	29
2.4.4. Dumblių sausa biomasės nustatymas .....	29
2.4.5. Mikrodumblių terpės pH vertės nustatymas.....	30
2.4.6. Mikrodumblių specifinio augimo greičio apskaičiavimas .....	30
2.5. Elektrinio impulsinio lauko poveikio, mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai, tyrimų metodika.....	30
2.5.1. Impulsinio elektrinio lauko poveikis <i>C. vulgaris</i> mikrodumblių gyvybingumui .....	31
2.5.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis <i>Delftia</i> sp. bakterijų gyvybingumui ..	31
2.5.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai.....	32
2.6. Statistinė duomenų analizė .....	32
3. tyrimų rezultatai ir jų aptarimas .....	33
3.1. Bakterijų identifikavimas.....	33
3.2. Mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveika.....	35
3.3. Elektrinio impulsinio lauko poveikis, mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai	43

3.3.1. Impulsinio elektrinio lauko poveikis <i>C. vulgaris</i> mikrodumblių gyvybingumui.....	43
3.3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis <i>Delftia</i> sp. bakterijų gyvybingumui .	44
3.3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai.....	45
Išvados.....	51
Santrauka.....	52
Summary .....	53
Literatūros sąrašas .....	54
Priedai.....	71

## SANTRUMPU SĄRAŠAS

$\mu$ s – mikrosekundės

16S rRNR – bakterijų šešiolikto subvieneto ribosominė ribonukleorūgštis

A – amperai

b. p. – bazės poros

*De novo* – lotyniška frazė, reiškianti „iš pradžių, iš naujo“

E – elektrinio lauko stipris

f – kintamo elektrinio lauko dažnis

g. k. – galutinė koncentracija

KFV – kolonijas formuojantis formuojantys vienetai

Konc. – koncentracija

MALDI-TOF – iš matricos lazeriu desorbuojanti ir jonizuojanti lėkio trukmės masių spektrometrija (angl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*)

mln. – milijonas

mS/cm – milisimensas centimetre

n – elektrinio lauko impulsų skaičius

ns – nanosekundės

OD – optinis tankis

PCA – Plate count agar mitybinė terpė

pH – vandenilio jonų koncentracijos tirpale matas

TEM – transmisinė elektroninė mikroskopija (angl. *Transmission Electron Microscope*), kai bandinys apšviečiamas lygiagrečiu elektronų pluoštu

TSA – triptono sojų agaras

TSB – triptono sojų sultinys

V – voltai

$\tau$  – elektrinio lauko poveikio trukmė

## ĮVADAS

Mikrodumbliai – fotosintetinantys primatai, aptinkami įvairiuose vandens telkiniuose, dirvose bei nuotekose. Jie atlieka svarbų vaidmenį ekosistemos medžiagų ir energijos apytakoje. Kitaip nei aukštesnieji augalai, mikrodumbliai geba užauginti didesnę biomasės kiekį, kupiną natūralių didelės pridėtinės vertės junginių (Wang ir kt. 2015; Madigan ir kt. 2019). Būtent dėl šių priežasčių mikrodumbliai įgyja vis didesnę svarbą biotechnologijų, maisto, farmacijos ir energetikos pramonės sektoriuose (Raheem ir kt. 2018; Galasso ir kt. 2019). Tačiau, siekiant patenkinti mikrodumblių ir jų sintetinamų junginių poreikį, būtina optimizuoti dumblių biomasės kultivavimo procesą. Dažnai šiam tikslui pasiekti vykdomas abiotinių veiksnių, kaip kultivavimo tipas, temperatūra, apšvietimas, pH ir kt., optimizavimas. Deja, šios strategijos ekonominis atsiperkamumas yra per mažas (Mohammad Mirzaie ir kt. 2015). Siekiant sumažinti kultivavimo kaštus galima pasitelkti natūralius mikrodumblių mikrobiotos biotinius veiksnus. Nustatytų tarpusavio sąveikų gausa, įgalina paspartinti mikrodumblių kultivavimą, naudojant teigiamu poveikiu pasižyminčius mikroorganizmus (Yao ir kt. 2019; Krug ir kt. 2020; Pascual ir kt. 2020). Vis dėlto, biotinių ir abiotinių veiksnių kaita gali inicijuoti tarpusavio sąveikų virsmą, teigiama ar neigiama kryptimi (Neuhauser ir kt. 2004; Liu ir kt. 2012).

Pakitusių, netinkamų mikrodumblių kultivavimui, sąlygų likvidavimui gali būti pasitelkiami fiziniai ir cheminiai metodai (Sun ir kt. 2018). Tačiau sonifikacija, UV spinduliuotė, antibiotikų terapija ar kiti metodai gali sukelti nepageidaujamą poveikį mikrodumblių ir jų sintetinamų produktų išėgai (Soto-Sierra ir kt. 2018). Vienas iš alternatyvių būdų selektyviai neutralizuoti mikroorganizmus kompleksinėje kultūroje galėtų būti impulsinio elektrinio lauko poveikis (angl. *electric pulsed field, PEF*). Žinoma, jog skirtingais elektrinio lauko impulsais veikiant mielių *Saccharomyces cerevisiae* ir *Lactobacillus* sp. bakterijas, galima sukelti neterminį, selektyvų pieno išrūgų pasterizavimą (Simonis ir kt. 2019). Šiuo metu impulsinio elektrinio lauko poveikis plačiai taikomas mikrodumblių genų modifikacijoms ir/ar medžiagų apykaitos inžinerijai sintetinamų didelės pridėtinės vertės junginių išskyrimo išėgos didinimui (Joannes ir kt. 2015; Dyo ir kt. 2018; Scherer ir kt. 2019). Tačiau mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai impulsinio elektrinio lauko poveikis dar nėra tyrinėtas.

### **Darbo tikslas.**

Nustatyti *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. bakterijų tarpusavio santykius ir jų pokytį impulsinio elektrinio lauko poveikyje.

### **Darbo uždaviniai:**

- Nustatyti *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. bakterijų tarpusavio sąveikos pobūdį;
- Įvertinti skirtingų impulsinių elektrinių laukų poveikį mikrodumbliams;
- Įvertinti skirtingų impulsinių elektrinių laukų poveikį bakterijų gyvybingumui;
- Įvertinti pasirinkto impulsinio elektrinio lauko poveikį mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Mikrodumbliai – naujausias biotechnologijų pramonės objektas

Biotechnologijos – vienas sparčiausiai augančių pramonės sektorių pasaulyje. Tai tarpdisciplininis sektorius apimantis farmacijos, chemijos, bioenergetikos, maisto ir kitus pramonės sritis. Jis paremtas gyvosios gamtos objektų ar jų sudėtinių dalių panaudojimu gerinant žmonijos gyvenimą (Keener ir kt. 2000). Tačiau, sparti technologijų plėtra suteikė galimybę patobulinti gyvosios gamtos objektus naudojant genų, baltymų ir ląstelių inžinerijos metodus. Visa tai padidino biotechnologijų pramonės svarbą ir suteikė didesnį vaidmenį pasaulio ekonomikoje. JAV ir Europa yra lyderiaujančios biotechnologijų sektoriuje, generuojančios daugiau kaip 140 milijardų JAV dolerių pajamų per metus (Matej Mikulic 2018).

Biotechnologijų pramonėje naudojami gyvosios gamtos objektai yra modeliniai organizmai. Dažnu atveju tai išsamiai išanalizuoti, lengvai laboratorinėmis sąlygomis kultivuojami organizmai, kurių gyvenimo ciklas trumpas, o reprodukcija greita. Naminės pelės (*Mus musculus*), mieliagrybiai (*Saccharomyces cerevisiae*), bakterijos (*Escherichia coli*) ar kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelių linijos (angl. *Chinese hamster ovary (CHO)*) – keletas dažniausiai naudojamų modelinių organizmų (Kim ir kt. 2012; Samie 2017; Yalcin ir kt. 2019). Tačiau pastarąjį dešimtmetį dėl plačių panaudojimo galimybių mikrodumbliams skiriama vis daugiau dėmesio biotechnologijų pramonėje ir apskritai pasaulio ekonomikoje (Gudmundsson ir kt. 2017; Archanaa ir kt. 2019; Dhanya ir kt. 2020; Low ir kt. 2020).

Mikrodumbliai – vienaląsčiai, greitai besidauginantys dumbliai, kurių kultivavimas nereikalauja specialių sąlygų. Mikrodumbliai, kaip ir tikrieji augalai, vykdo oksigeninę fotosintezę, kurios metu šviesos energija paverčiama chemine energija (Madigan ir kt. 2019). Tačiau mikrodumblių bei melsvabakterių vykdoma fotosintezė yra pranašesnė nei tikrųjų augalų dėl evoliucionuojant įgyto anglies dvideginio (CO<sub>2</sub>) koncentravimo mechanizmo. Jis įgalina kelių anglies formų (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ir CO<sub>2</sub>) koncentravimą ląstelėje net ir tuo atveju, kai aplinkoje neorganinės anglies koncentracija itin maža. Aplink mikrodumblių pirenoidą sukonzentruota anglis veikiant RuBisCo (ribulozės-1,5-difosfato karboksilazė / oksigenazė) yra paverčiama į organinę anglies formą / cheminę energiją (Wang ir kt. 2015). Prie dumblių vykdomos fotosintezės efektyvumo prisideda ir geresnės ekspozicijos į saulę bei kultivavimui nereikalingi dideli žemės plotai. Bendrai ant žemės augančių augalų fotosintezės metu fiksuojama iki 50 % aplinkoje esančios neorganinės anglies. Tuo tarpu mikrodumbliai geba fiksuoti iki 80 % neorganinės anglies. Tai efektyviausias anglies junginių fiksavimo procesas (Dismukes ir kt. 2008; Wang ir kt. 2015).



Idealiomis sąlygomis didelė dalis fotosintezės metu gautos cheminės energijos dumbliuose yra panaudojama reprodukcijos procesui. Vis didėjanti mikrodumblių populiacija sąlygoja biomasės kaupimąsi. Skirtingai nei tikrųjų augalų, mikrodumblių biomasė nėra paskirstoma papildomiems energetiškai daug kainuojantiems audiniams, kaip stiebas, lapai ir kt. Taip pat dumblių biomasės kaupimui sezoniškumas neturi didelės įtakos. Tai lemia galimybė lengvai kontroliuoti kultivavimo sąlygas (temperatūra, apšvietimas, maistinės medžiagos ir kt.), kurių pokyčiai gali indukuoti ir naudingų cheminių junginių sintezę. Taigi, greita reprodukcija, gebėjimas apsirūpinti chemine energija fiksuojant neorganinę anglį bei kaupti didelę biomasę yra esminiai veiksniai, įgalinantys mikrodumblius naudoti kaip biokuro, bioaktyvių junginių ir maisto šaltinį (Sayre 2010; Ravishankar ir kt. 2019).

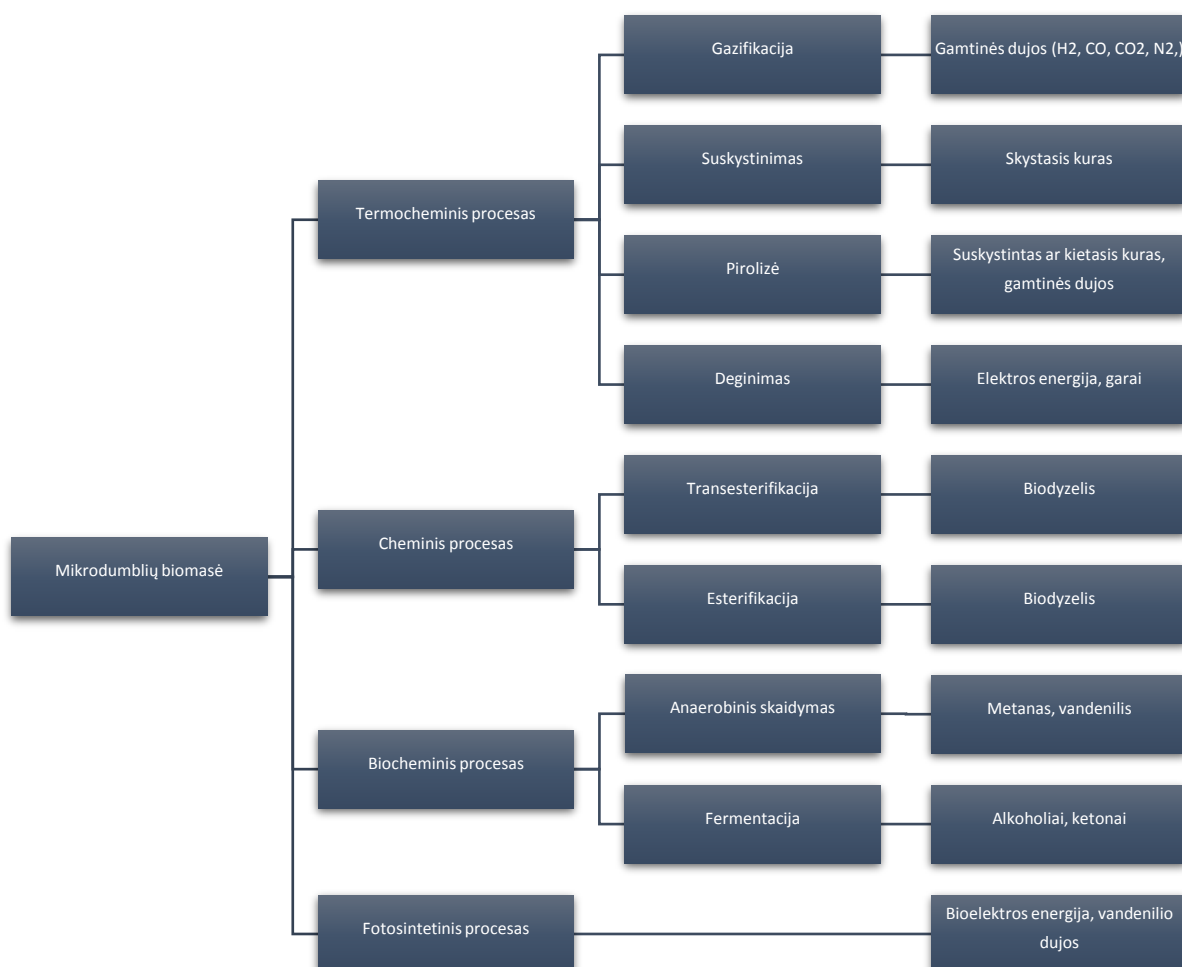
Žmonių ūkinė veikla ir vis didėjantis iškastinio kuro sunaudojimas yra pagrindinės klimato kaitos priežastys. Beveik 87 % išmetamų CO<sub>2</sub> dujų yra sugeneruojamos antropogeninės veiklos, naudojant akmens anglis (43 %), naftą (36 %) ir gamtines dujas (20 %) (Goli ir kt. 2016). Siekiant užkirsti kelią tolesnei klimato kaitai būtina mažinti anglies išmetimą. Tai mėginama pasiekti naudojant tvarius energijos išteklius, kaip, pavyzdžiui, atsinaujinančią vėjo ir saulės energiją ar biomasės kurą (energiniai pasėliai ir žemės ūkio bei miško kirtimo ar medienos perdirbimo atliekos). Tačiau atsinaujinančios energijos infrastruktūros didelė kaina, energijos kaupimo ir tiekimo sistemų trūkumai yra esminiai technologijos diegimo trikdžiai (Nelson ir kt. 2015). Manoma, jog ekonomiškiausias, mažai kaštų bei priežiūros reikalaujantis biokuro šaltinis yra energiniai augalai. Dėl didelio kaupiamo biomasės kiekio bei riebalų koncentracijos mikrodumbliai išsiskiria iš energinių pasėlių gausos. Mikrodumbliai geba kaupti 20–80 % (nuo sausos biomasės) riebalų, kurių vidutinis produktyvumas – 4,5–7,5 tonos hektare per metus (t/ha/m) (žr. 1.1 lentelę) (Tsukahara ir kt. 2005; Weyer ir kt. 2010).

1.1 lentelė. Mikrodumblių sausos biomasės sudėtis (Vadiveloo ir kt. 2016: 363–374; Kumar ir kt. 2017; Han ir kt. 2019: 2377; Hossain 2019: 2594–2607)

Mikrodumbliai	Baltymai (%)	Angliavandeniai (%)	Lipidai (%)
<i>Botryococcus braunii</i>	40	2	25–75
<i>Chlorella</i> sp.	51–58	12–17	28–56
<i>Nannochloropsis</i> sp.	30–40	7–10	31–68
<i>Scenedesmus</i> sp.	8–56	10–52	2–40
<i>Porphyridium aeruginosum</i>	31,6	13,7	45,8

Tuo tarpu sojų pupelių sintetinių riebalų produktyvumas siekia 0,4 t/ha/m, rapsų – 0,7 t/ha/m (Chisti 2007). Prie pastarųjų privalumų priskiriami minėti faktoriai – fotosintetinis efektyvumas, greita reprodukcija bei kultivavimui nereikalingi dideli derlingos žemės plotai (Posadas ir kt. 2017; Ferreira ir kt. 2019).

Biokuras panaudojant mikrodumblių biomasę gali būti gaminamas įvairiais metodais. Dažniausiai biokuro gamyba klasifikuojama į biocheminius, cheminius ir termocheminius procesus (Tsukahara ir kt. 2005; Hossain 2019). Be minėtų procesų, išskiriamas dar vienas itin sparčiai vystomas bioelektrocheminis procesas, vadinamas mikrobiniu kuro elementu (žr. 1.1 pav.). Šio proceso veikimas pagrįstas egzoelektrogeninių mikroorganizmų gebėjimu utilizuoti fotosintezės metu susidariusias vandenilio dujas ir/ar organines medžiagas bei generuoti elektronus. Susidarę elektronai, tekėdami nuo anodo link katodo, atlieka naudingą elektros srovės darbą – generuoja elektros energiją (Rosenbaum ir kt. 2010; Qi ir kt. 2018). Biokuro gamybos procesą lemia gaminti norimo biokuro tipas, jo kokybė bei žaliavos sudėtis. Pavyzdžiui, mikrodumblių biomasės biocheminė organinė (C, N, O) ir neorganinė (N, K, Na, Mg, Ca...) sudėtis turi įtakos biokuro energinei vertei. Nustatyta, jog didesnė atominio



1.1 pav. Mikrodumblių panaudojimas biokuro gamyboje (Koyande ir kt. 2019)

deguonies koncentracija, lyginant su atominė anglimi, lemia mažesnę išskirtos energijos kiekį. Tuo tarpu kai atominės anglies koncentracija didesnė, biokuras energiškai naudingesnis (McKendry 2002; Ali ir kt. 2015). Taip pat dumblių biomasės drėgmės kiekis gali padėti pasirinkti efektyviausią biokuro gamybos procesą. Kai biomasės drėgmė mažesnė nei 50 %, rekomenduojama tiesiogiai deginti biomasę. Kai biomasės drėgmė viršija 50 %, rekomenduojami biocheminiai biokuro gamybos procesai.

Norint pagaminti biokurą, kuris turi didžiausią potencialą pakeisti naftos dyzeliną, rekomenduojama vykdyti transesterifikacijos procesą (Hossain 2019). Taigi, mikrodumblių generuojama didelė biomasė yra puiki žaliava biokuro gamybai. Tačiau technologijos optimizavimas ir investicijų ekonominis atsiperkamumas stabdo plėtrą pasauliniu mastu. Prie šių problemų sprendimo prisideda ir didžiosios pasaulio valstybės. Viena iš jų – JAV, kurios Energetikos departamentas 2019 m. paskyrė daugiau nei 79 milijonus JAV dolerių bioenergetikos (tarp jų – ir biokuro bei bioproduktų) tyrimams ir vystymui.

Farmacijos pramonė – dar vienas didelio pasisekimo susilaukęs sektorius, kurio produktų sudėtyje yra mikrodumblių ar jų sintetinių bioaktyvių junginių. Viena iš dešimties didžiausių mikrodumblius kultivuojančių įmonių – *Cyanotech Corporation* – 2018 m. paskutinįjį ketvirtį uždirbo daugiau nei 10 mln. JAV dolerių (Cyanotech 2018 Annual Report, žiūrėta: 2020 04 16 15:31). Tai didžiausias vieno ketvirčio pelnas už maisto papildus, kurių pagrindinė sudedamoji dalis – astaksantinas. Tai vienas iš stipriausių antioksidaciniu bei imuninį atsaką stiprinančiu poveikiu pasižyminčių karotinoidų, išskirtas iš *Haematococcus pluvialis* mikrodumblių (Zgheib ir kt. 2018). Nustatyta ir daugiau mikrodumblių sudėtyje esančių pigmentų (fukoksantinas, fikobiliproteinai), kurie pasižymi ne tik antioksidaciniu, bet ir uždegimą slopinančiu, ląstelių atsinaujinimą skatinančiu bei nuo diabeto saugančiu poveikiu (Wang ir kt.; Goiris ir kt. 2015; Zhang ir kt. 2015). Kita itin aktuali mikrodumblių bioaktyviųjų medžiagų grupė – citotoksiniu poveikiu pasižymintys junginiai. Šiai bioaktyviųjų junginių grupei priskiriami iš dumblių išskiriami lipidai, fikobiliproteinai bei polisacharidai. Vienas plačiausiai ištyrinėtų nuo vėžio saugančių bioaktyviųjų junginių yra fukoidanas (Wang ir kt. 2019). Tai kompleksinis vandenyje tirpus sulfatinis heteropolisacharidas, išskiriamas iš dumblių ląstelės sienelės. Tiek *in vitro*, tiek *in vivo* eksperimentų metu įrodytas fukoidano gebėjimas inicijuoti vėžinių ląstelių apoptozę aktyvinant kaspazių ir mitogenais aktyvinamos baltymų kinazės (angl. *mitogen-activated protein kinase (MAPK)*) signalinius kelius (Yamasaki-Miyamoto ir kt. 2009; Jin ir kt. 2010). Taip pat fukoidanas geba inhibuoti angiogenezės, vėžio proliferacijos procesus bei sinergiškai veikti kartu chemoterapiniais preparatais (Alekseyenko ir kt. 2007; Yan ir kt. 2015). Be viso to iš mikrodumblių išskirta

bioaktyvių junginių, pasižyminčių antibakteriniu, antivirusiniu bei antialerginiu poveikiu (Raposo ir kt. 2014; Senhorinho ir kt. 2015; Deniz ir kt. 2017). Be minėtų farmakologinių savybių dumbliai yra polinesočiųjų riebalų rūgščių (omega-3 ir omega-6) ir vitaminų šaltinis (Guihéneuf ir kt. 2013). Atsižvelgiant į išvardintas dumblių ir jų sintetinių bioaktyviųjų junginių savybes mikrodumbliai yra puiki žaliava kuriant vaistinius preparatus, maisto papildus bei įvairius kosmetikos produktus (Mourelle ir kt. 2017; Galasso ir kt. 2019).

Šiomis dienomis mūsų planetoje yra daugiau nei 7,7 milijardo gyventojų (Worldometer „Pasaulio populiacijos laikrodis“ (žiūrėta: 2020 05 20 10:56). Prognozuojama, jog populiacijos augimo tendencija išliks ir 2050 m. planetoje jau bus 9,8 milijardo gyventojų (United Nations Department of Economic and Social Affairs 2017). Šis nenumaldomas populiacijos augimas tampa esminiu iššūkiu maisto pramonei siekiant užtikrinti kokybiško maisto poreikį. Manoma, jog 2050 m. kokybiško maisto poreikis bus net 70 % didesnis nei šiomis dienomis. Siekiant užtikrinti maisto produktų poreikio patenkinimą ieškoma naujų žaliavų šaltinių. Nustatyta, jog mikrodumbliai yra tinkama žaliava efektyviai maisto produktų ar jų sudedamųjų dalių gamybai (Smetana ir kt. 2017). Mikrodumbliai – ne tik lengvai, greitai kultivuojami mikroorganizmai, bet ir įvairių maistinių medžiagų šaltinis (Koyande ir kt. 2019). Pavyzdžiui, *Chlorella* sp. ir *Arthrospira* sp. mikrodumbliai geba kaupti didelius kiekius baltymų, kurių sudėtyje gausu vertingų/nepakeičiamųjų aminorūgščių (Becker 2007). Dėl minėtų savybių mikrodumbliai yra naudojami miltinių gaminių (duona, sausainiai, makaronai) bei augalinės mėsos gamyboje (Caporgno ir kt. 2018). Be to, mikrodumblių sintetiniai riebalai, gausūs sterolių, fosfolipidų, glikolipidų ir kt., panaudojami lipidinių miltelių gamyboje. Tai inovatyvus produktas, galintis pakeisti kiaušinius ir sumažinti suvartojamų „blogųjų“ riebalų kiekį (Pina-Pérez ir kt. 2017; Ravishankar ir kt. 2019). Taip pat dumbliai yra puikus angliavandenių šaltinis (žr. 1.1 lentelę). Alginatas, agaras ir karageninas – dažniausiai iš dumblių išskiriami polisacharidai, naudojami maisto pramonėje produktams (jogurtai, padažai, konservuota mėsa) sutirštinti arba stingdyti (Ścieszka ir kt. 2019). Be viso to, dumbliuose gausu polinesočiųjų riebalų rūgščių, mikroelementų ir vitaminų (Guihéneuf ir kt. 2013b). Nustatyta, jog pieno produktai, papildyti kalcį kaupiančiais mikrodumbliais, padidina organizmo įsisavinamo kalcio koncentraciją. Tai itin aktualu žmonėms, stokojantiems kazeiną degraduojančių fermentų, kurie atsakingi už kalcio išlaisvinimą iš tarpusavio sąveikos su kazeinu (Cofrades ir kt. 2013). Dėl minėtos maistinių medžiagų sudėties bei papildomų teigiamų savybių mikrodumbliai gali būti naudojami ne tik kaip žmonių maistas ar jo sudedamoji dalis, bet ir kaip gyvūnų pašaras. Nustatyta, jog galvijų pašaras, praturtintas dokozaheksaeno rūgštis (omega-3 polinesočiosios riebalų rūgštys) sintetinančiais *Aurantiochytrium limacinum* dumbliais, lėmė padidėjusią pieno gamybą bei jo riebalų rūgščių profilio pokytį. Dumbliais šertų galvijų piene padaugėjo omega-3

ir omega-6 polinesočiujų riebalų rūgščių bei sumažėjo sočiųjų riebalų rūgščių, lyginat su kontrolinių galvijų pienu (Moran ir kt. 2018). Be to, galvijų šėrimas dumbliais praturtintu pašaru gali sumažinti iš prieskrandžio išskiriamų metano dujų kiekį ir prisidėti kovojant su klimato kaita (Kinley ir kt. 2016; Sucu 2020). Dumbliais praturtintų pašarų teigiamas poveikis gyvūno sveikatai užfiksuotas tiek kiaulininkystės, tiek žuvininkystės sektoriuose (Furbeyre ir kt. 2017; Marques ir kt. 2019). Taigi, mikrodumbliai pasižymi plačiu maistinių medžiagų spektru ir suteikia ne tik energijos, bet ir turi teigiamą poveikį sveikatai. Tuo tarpu galimybė produktyviai kultivuoti didelę biomasę be derlingos žemės plotų bei didelių investicijų gali padėti užtikrinti pakankamą kokybiško maisto poreikį bei prisidėti prie bendros gerovės vartotojų atžvilgiu.

Be minėtų pramonės sektorių, nuotekų valymas ir sunkiai yrančių junginių utilizavimas yra naujai vystoma mikrodumblių panaudojimo sfera. Daugelis industrijų (gyvulininkystės, maisto, naftos produktų ir kt.) generuoja milžiniškus kiekius nuotekų, kurias prieš išleidžiant į gamtinę aplinką būtina išvalyti. Norint užtikrinti nuotekų valymo procesą būtina pasitelkti sudėtingas, ekonomiškai mažai atsiperkančias technologijas. Todėl mikrodumblių kultivavimas yra puiki alternatyva siekiant sumažinti nuotekose esančių maistinių medžiagų (azoto, fosforo). Šiems fototrofiniams mikroorganizmams augti reikalingos didelės azoto, fosforo koncentracijos, kurių gausu nuotekose. Keli tyrimai parodė, jog  $\text{NO}_3\text{-N}$  ir  $\text{PO}_4\text{-P}$  pašalinimo efektyvumas nuotekose gali siekti 80–97,8 % kultivuojant natūralius ir/ar dirbtinius mikrodumblių konsorciumus (Li ir kt. 2011; Renuka ir kt. 2013; Álvarez-Díaz ir kt. 2017). Taip pat nustatyta dumblių gebėjimas absorbuoti toksinius sunkiuosius metalus (aliuminį, varį, vanadį, gyvsidabrij, seleną) bei chromogeninius substratus (Kongo raudonasis) (Hernández-Zamora ir kt. 2014; Dewi ir kt. 2018; Oyebamiji ir kt. 2019). Be viso to, naudojant dumblius nuotekų valymo procese be didelių kaštų generuojama didesnė biomasė, kuri gali būti panaudojama biokuro gamyboje (Li ir kt. 2011; Álvarez-Díaz ir kt. 2017).

Bendrai, mikrodumbliai yra puikus modelinis organizmas, kurio dideli biomasės kiekiai gali būti panaudoti maisto, pašarų, biokuro ir vertingų cheminių junginių gamybai bei nuotekų valymui. Tačiau, norint komercializuoti šias technologijas būtina sumažinti dabartines mikrodumblių biomasės gamybos, kultivavimo sąnaudas (Zhu ir kt. 2019).

## 1.2. Mikrodumblių kultivavimas

Nors mikrodumbliai turi daug panašumų su augalinėmis ląstelėmis, tačiau jų reprodukcija yra kur kas greitesnė. Įprastomis kultivavimo sąlygomis viena *Chlorella* sp. mikrodumblio motininė ląstelė per 24 valandas pasidalija į ~4 dukterines ląsteles (Yamamoto ir kt. 2004; Yamamoto ir kt. 2005). Reprodukcijos procesas gali būti pagreitintas įvertinus ir

optimizavus kultivavimo sąlygas (temperatūrą, apšvietimo intensyvumą ir trukmę, maistinių medžiagų koncentraciją) (Manisha 2007). Atsižvelgiant į mitybos pobūdį, mikrodumblių kultivavimas skirstomas į autotrofinį, heterotrofinį arba miksotrofinį augimą (Mohammad Mirzaie ir kt. 2016). Autotrofinio kultivavimo metu pagrindinis anglies šaltinis yra neorganinė anglies forma, pavyzdžiui, atmosferoje esančios CO<sub>2</sub> dujos. Šiuo būdu mikrodumbliai gali būti kultivuojami dirbtinai sukurtuose vandens telkiniuose (tvenkiniuose, baseinuose) arba uždaruose fotobioreaktoriuose. Atvirų tvenkinių infrastruktūra bei įrengimas yra paprasti ir reikalaujantys mažai kaštų. Tačiau kultivuojant dumblius atviruose vandens telkiniuose būtinas nuolatinis proceso monitoringas siekiant sumažinti fizinės ir biologinės taršos riziką. Neužkirtus kelio kitų dumblių ar patogenų invazijai kultivuojamų dumblių populiacija gali sunykti (Davis ir kt. 2011). Antra vertus, atviruose tvenkiniuose kultivuojami aplinkos veiksniams atsparūs mikrodumbliai gali papildomai sumažinti NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> dujų ar vandens telkiniuose esančių kenksmingų cheminių junginių kiekius (Choi ir kt. 2013; Sadeghizadeh ir kt. 2017; Dewi ir kt. 2018). Vis dėlto autotrofinėmis sąlygomis kultivuojami dumbliai dauginasi nereguliariai. Tai lemia kultivavimo sąlygų netolygumas dugne (30–70 cm gylyje) ir paviršiuje esančių mikrodumblių atžvilgiu. Ši problema sprendžiama diegiant aeracines sistemas, kurios tolygiai paskirsto temperatūrą, šviesą, CO<sub>2</sub> bei maistines medžiagas visame vandens telkinyje. Tačiau aeruojant didelius baseinuose esančius vandens kiekius išauga viso technologinio proceso kaštai (Davis ir kt. 2011).

Aplinkos taršos rizikos bei papildomų išlaidų likvidavimui naudojami uždari fotobioreaktoriai. Dažnai tai iki 20 cm skersmens saulės šviesai pralaidūs vamzdžiai, kuriuose kultivuojami mikrodumbliai aeruojami CO<sub>2</sub> dujomis. Galimos ir kitos fotobioreaktorių sistemos – tuščiaavidurė plokštė, kolona, daugiavamzdė konstrukcija, tačiau jų įrengimui reikia didelių investicijų (Satpati ir kt. 2018). Tačiau uždaruose sistemose galima užtikrinti visų kultivavimo sąlygų (pH, apšvietimo intensyvumo, temperatūros, tiekiamo anglies dvideginio koncentracijos ir pan.) kontrolę bei efektyviai generuoti dumblių biomasę. Be viso to, fotobioreaktoriuose užauginta didesnio tankio biomasė yra kokybiškesnė didelės pridėtinės vertės junginių išskyrimui, lyginant su atviruose baseinuose užauginta (de Vree ir kt. 2015; Narala ir kt. 2016). Tai itin svarbus aspektas panaudojant mikrodumblius kaip žaliavą kuriant farmacijos, kosmetikos ar maisto produktus (Mourelle ir kt. 2017).

Heterotrofinio dumblių kultivavimo metu pagrindinis anglies šaltinis yra organinė anglis. Dažnai kaip anglies šaltinis naudojamas cukrus (gliukozė) ar organinės rūgštys, pavyzdžiui, acetatas, glicerolis ir gliutamatas (Daliry ir kt. 2017). Nustatyta, jog maksimalus biomasės optinis tankis (2 g/L kultivuojant 6 dienas) bei aukščiausias lipidų produktyvumas

(54 mg/L per dieną) pasiekiamas naudojant gliukozę (1 %) (Liang ir kt. 2009). Heterotrofinis mikrodumblių kultivavimas dažnai vykdomas maišomuose bioreaktoriuose ar fermentoriuose. Tokiu būdu išvengiama aplinkos taršos rizikos, pasiekiamas aukštas biomasės produktyvumas bei gaunama didesnė sintetinamų produktų išeiga. *C. vulgaris* iš mikrodumblių išsiskiria oksidaciniu stabilumu kultivuojant heterotrofinėmis sąlygomis net iki 12 savaičių. Tai parodo, jog mikrodumblių sintetintos nepakeičiamosios riebalų rūgštys pasižymi aukštu stabilumu bei išaugo savo energinę vertę (Canelli ir kt. 2020). Tačiau mažas investicijų į infrastruktūrą bei kultivavimo sąnaudų atsiperkamumas išlieka esmine kliūtimi tolesnei plėtrai.

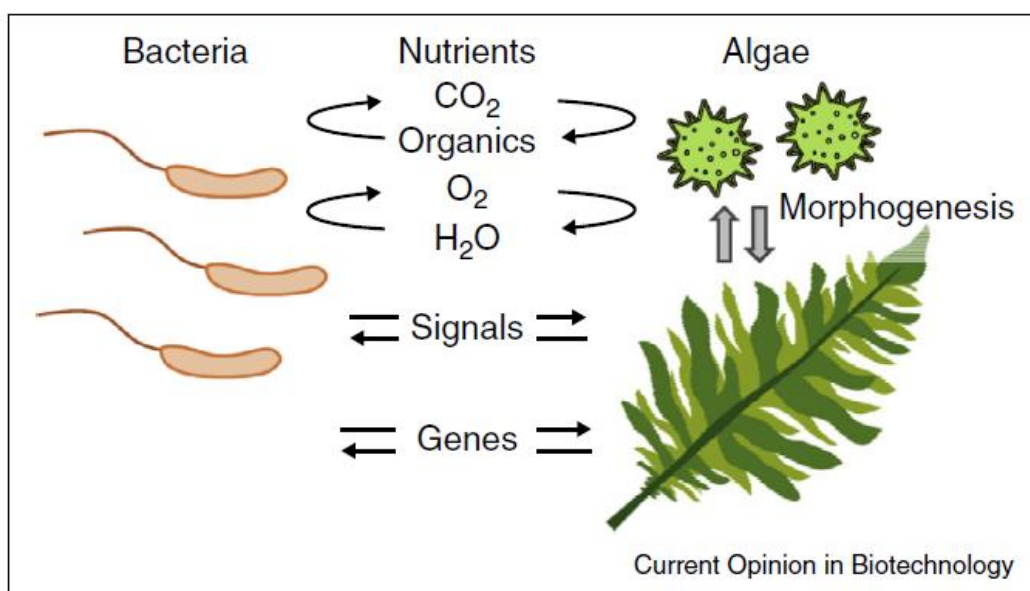
Minėtą problemą mėginama spręsti panaudojant alternatyvias mitybines terpes, pavyzdžiui pigias pramonines atliekas. Tai yra puikus mikсотrofinio kultivavimo pavyzdys. Šio kultivavimo metu mikrodumbliai nepriklauso nuo vieno organinio ar neorganinio anglies šaltinio. Mohammad Mirzaie ir tyrėjų komanda nustatė jog mikсотrofinėmis sąlygomis, naudojant cukranendrių melasą ir kukurūzų perdirbimo skystį, *C. vulgaris* maksimalus biomasės optinis tankis pasiekė 2,62 g/L, o lipidų produktyvumas 0,86 g/L per dieną. Šie rezultatai buvo keletą kartų didesni, nei kultivuojant autotrofinėmis ar heterotrofinėmis sąlygomis (Mohammad Mirzaie ir kt. 2015)

Siekiant efektyviai optimizuoti dumblių kultivavimo skalės didinimą kombinuojami keli dumblių kultivavimo būdai. Barros ir kolegos įvertino dviejų pakopų heterotrofinio-autotrofinio kultivavimo efektyvumą, didinat kultivavimo skalę. Pirmoje stadijoje *C. vulgaris* buvo kultivuojami fermentoriuje. Antroje stadijoje heterotrofinėmis sąlygomis užauginti mikrodumbliai perkelti tolesniam kultivavimui į fotobioreaktorių (autotrofines sąlygas). Gauta dumblių biomasė pasiekė 174,5 g/L. Tai didžiausias užaugintas biomasės kiekis kultivuojant *C. vulgaris* mikrodumblius 5 litrų fotobioreaktoriuje (Barros ir kt. 2019).

Produktyviam mikrodumblių kultivavimui gali būti pasitelkiamos natūralios mikrodumblių aplinkos savybės. Jau minėta, kad autotrofinio kultivavimo esminė problema – aplinkos tarša. Ją sukelia mikrodumblių buveinės biotiniai ir abiotiniai veiksniai bei jų komponentų pokyčiai. Pastarųjų – abiotinių – veiksnių pokyčiai (temperatūros, apšvietimo, pH, maistinių medžiagų svyravimai) lemia mikrodumblių kultivavimo produktyvumą. Pavyzdžiui, Suthar ir Verma nustatė optimalias *C. vulgaris* kultivavimo sąlygas: 18/6 val. dienos/nakties režimas, 7–9 pH ir 20–30 °C temp. Tuo tarpu maistinių medžiagų kompozicija – N–NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (50 mg/L), PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (25 mg/L). Optimizuotų sąlygų produktyvumas svyravo 159 mg/L per 1 dieną ir 114 mg/L per dieną atitinkamai naudojant N–NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ir PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>. Chlorofilo (*a* ir *b*) bei cukrų

koncentracijos pokyčiai tiesiogiai koreliavo su maistinių medžiagų pokyčiais terpėje (Suthar ir kt. 2018).

Tuo tarpu aplinkos biotinių veiksnių gausa reikalauja individualaus kiekvieno komponento ištyrimo. Mikrodumblių aplinkoje galima aptikti virusų, kitų mikrodumblių, grybų, vandens augalų, bakterijų bei pirmuonių, kurie gali tiesiogiai daryti įtaką dumblių augimui (Kraft ir kt. 2020; Kumar ir kt. 2019). Mikrodumblių ir jų aplinkoje esančių mikroorganizmų tarpusavio sąveika skirstoma į parazitinius, mutualistinius ir komensalistinius santykius (Ramanan ir kt. 2016). Tarpusavio sąveiką įgalina mikroorganizmų sintetinamų organinių ir neorganinių cheminių junginių mainai. Tai gali būti genai, signalinės molekulės, vitaminai, hormonai, maistinės medžiagos ir kiti junginiai (Teplitski ir kt. 2011; Kouzuma ir kt. 2015; Cirri ir kt. 2019; Heo ir kt. 2019) (žr. 1.2 pav.)



1.2 pav. Dumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikos komponentai (Kouzuma ir kt. 2015)

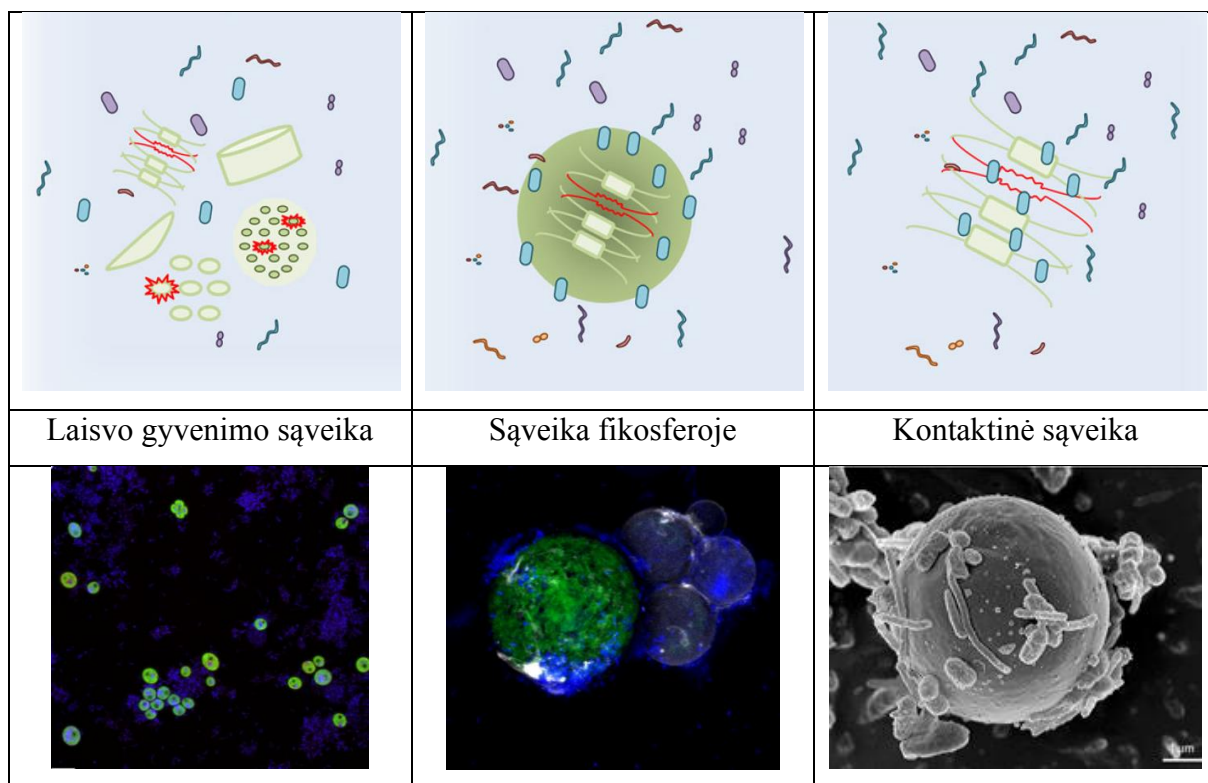
### 1.3. Mikrodumblių ir jų aplinkoje dominuojančių mikroorganizmų tarpusavio sąveika

Mikrodumblių ir kitų mikroorganizmų tarpusavio sąveika pagal objektų padėtį erdvėje gali būti suskirstyta į keletą lygmenų (žr. 1.3 pav.). Pavyzdžiui, laisvai gyvenantys mikroorganizmai gali sąveikauti tiek su vienaląsčiais, tiek su kolonijas formuojančiais ar daugialąsčiais dumbliais. Tačiau vandens tūrio atžvilgiu sąveikoje dalyvaujančių mikroorganizmų koncentracijos yra itin mažos. Todėl galima teigti, kad tolima sąveika tarp laisvai plūduriuojančių organizmų yra silpna, neturinti didelės įtakos tarp sąveikos komponentų (Meyer ir kt. 2017).

Artimesnės tarpusavio sąveikos lygmuo – fikosfera (angl. *phycosphere*). Tai mikroskopinė, galinti tęstis iki kelių šimtų mikrometrų ( $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{m}$ ), zona aplink dumblio



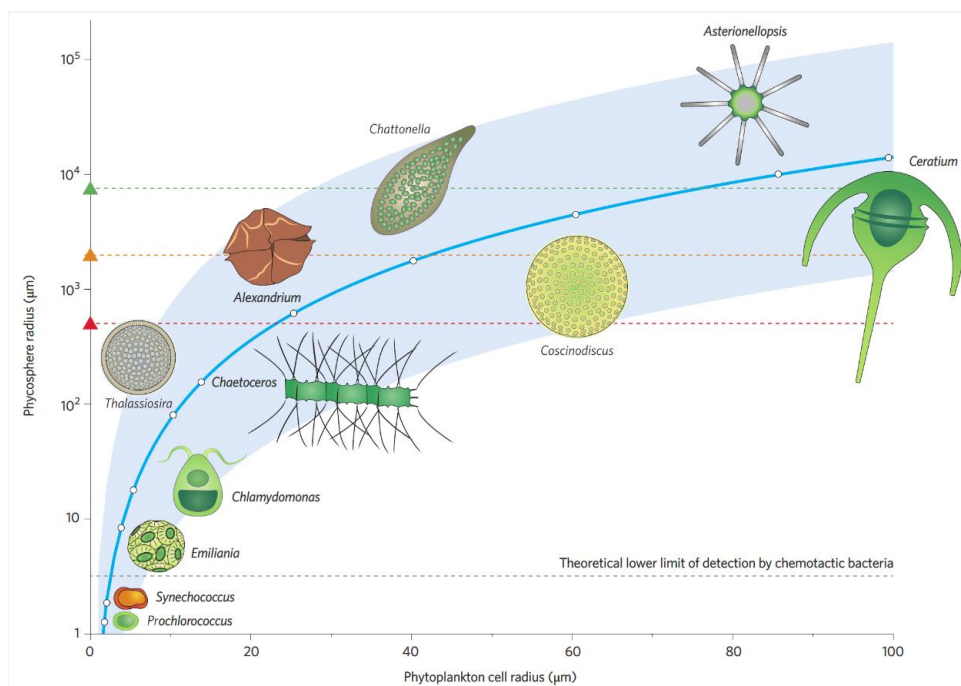
ląstelę, gausi organinių medžiagų (Bell ir kt. 1972; Grosser ir kt. 2012). Šis erdvinis organinių medžiagų klasteris gali susiformuoti dėl normalaus mikrodumblių metabolizmo vyksmo, kintančių aplinkos sąlygų, įvykus ląstelės lizei ar kitų priežasčių. Didžiąją dalį fikosferos sudaro, dumblių išskiriama, ištirpusi organinė anglis (angl. *dissolved organic carbon (DOC)*), kurią papildo signalinės molekulės ir fiziologiškai aktyvūs antriniai metabolitai – alelocheminės medžiagos (fitoncidais, antibiotikai, kolina) (Meyer ir kt. 2017; Tan ir kt. 2019).



1.3 pav. Mikroorganizmų tarpusavio sąveikos lygmenys, erdvės atžvilgiu (Krohn-Molt ir kt. 2017; Meyer ir kt. 2017; Krug ir kt. 2020)

Minėtų cheminių medžiagų koncentravimąsi aplink ląstelę lemia ir molekulių poliškumas. Hidrofilinių molekulių (polinių aminorūgščių) difuzija vandenyje yra kur kas greitesnė nei hidrofobinių molekulių. Tuo tarpu dauguma signalinių molekulių (diatomų feromonai, bakterijų homoserino laktonai) yra hidrofobinės, kurios sunkiai difunduoja (Amin ir kt. 2012). Fikosferos cheminė sudėtis, priklausomai nuo dumblių rūšies, fiziologinių ar aplinkos pokyčių yra kintanti ir galinti siekti milimoliarinę ( $1 \text{ mM} = 10^{-3} \text{ M}$ ) koncentraciją (Grosser ir kt. 2012). Tuo tarpu fikosferos zonos perimetrą labiausiai lemia dumblio ląstelės dydis (žr. 1.4 pav.) (Seymour ir kt. 2017). Manoma, jog fikosfera atlieka mikrodumblių apsauginę funkciją, apsunkindama difuziją bei mažindama toksinių junginių įtaką (Dutz ir kt. 2005). Taip pat didelė DOC koncentracija atlieka chemoatraktanto funkciją pritraukiant simbiotinius ir/ar mutualistinius mikroorganizmus. Dėl minėtos fikosferos funkcijos mikrodumbliai mainais už organinę anglį yra aprūpinami mikroorganizmų sintetiniais vitaminais (vit. B<sub>12</sub>) ar kitomis medžiagomis (Croft ir kt. 2005; Ramanan ir kt. 2016; Heo ir kt.

2019). Dėl metodologinių priemonių trūkumo dažnu atveju fikosferos analizė ir vizualizacija yra ribota. Tačiau Smriga ir komandos atliktas tyrimas patvirtino fikosferos egzistenciją bei dinamiškumą. Vaizdo įrašė užfiksuota judrių bakterijų, išskirtų iš gausios vandenyno bendruomenės, grupavimasis aplink fitoplanktono ląstelę. Šis chemotaksis formuoja išsiskiriantį klasterį lyginant su likusia terpės dalimi (Smriga ir kt. 2016).



1.4 pav. Fikosferos – mikrodumblio ląstelės dydžio priklausomybė (Seymour ir kt. 2017).

Mikroorganizmai geba pasisavinti naudingus cheminius junginius ne tik iš fikosferos, bet ir tiesiogiai iš pačių dumblių. Tiesioginio kontakto metu prie dumblio membranos prisitvirtinę mikroorganizmai gali moduluoti dumblių aktyvumą bei išskiriamų medžiagų tiekimą į aplinką. Ši strategija dažnai naudojama algicidinių bakterijų, kurios, sintetindamos chitinazes, celiuliazes ar kitus bioaktyvius junginius, gali inicijuoti dumblio ląstelės morfologinius pakitimus, slopinti augimą ar tiesiogiai lizuoti ląstelę (Roth ir kt. 2008; Li ir kt. 2016; Ramanan ir kt. 2016; Meyer ir kt. 2017).

Dumblių ir mikroorganizmų tarpusavio sąveika gali būti skirstoma ne tik pagal objektų padėtį erdvinėje, bet ir sisteminį poveikį objektų atžvilgiu. Viena iš gana plačiai išanalizuotų tarpusavio sąveikų – parazitizmas. Šios sąveikos metu tik vienas iš objektų patiria tiesioginį teigiamą poveikį, o likusysis – neigiamą (žr. 1.2 lentelę). Gausu mikrodumblius parazitiškai veikiančių virusų, grybų ir bakterijų (Suttle 2007; Hess ir kt. 2012; Letcher ir kt. 2013; Carney ir kt. 2014; Balabanova ir kt. 2018; Bowman 2019). Pastarųjų bakterijų parazitinis vyksmas išsamiai išanalizuotas ir gali pasireikšti keliais būdais (Ramanan ir kt. 2016). Visai neseniai įrodyta, jog *Phaeobacter inhibens* geba inicijuoti tiesioginę ir apoptozę panašią mikrodumblių

ląstelių mirtį (Bramucci ir kt. 2019). Be tiesioginio ląstelės ardymo galima ir kita parazitizmo forma – konkurencija dėl maisto medžiagų. Nustatyta, jog kultivuojant *Dunaliella* sp. dumblius su *Alteromonas* sp. bakterijomis azoto stokojančiomis sąlygomis dumblio ląstelė fiziškai sumažėja/susitraukia, lyginant su ląstelėmis, augintomis normaliomis sąlygomis. Ši indikacija susijusi su dumblių patiriamu maistinių medžiagų trūkumu (Le Chevanton ir kt. 2016). Panašūs rezultatai gauti kultivuojant dumblius su parazitinėmis bakterijomis fosforo limituojančiomis sąlygomis (Mindl ir kt. 2005). Vienas iš paradoksalių bakterijų parazitinio poveikio pavyzdžių – dumblių atsparumo padidėjimas nepalankioms aplinkoms sąlygoms. Eric Fouilland ir kolegų atliktas tyrimas parodė, jog kultivuojant *Thalassiosira delicatula* dumblius su patogeninėmis bakterijomis įprastomis sąlygomis dumblių gyvybingumas sumažėja 50 %. Tuo tarpu kultivuojant grynus dumblius (be bakterijų) metalų ir pesticidų turinčioje terpėje dumblių specifinis augimo greitis sumažėja iki  $0,3 \text{ d}^{-1}$  ( $\text{d}^{-1}$  = per dieną). Tačiau kultivuojant *T. delicatula* su parazitinėmis bakterijomis toje pačioje teršalų terpėje dumblių specifinis augimo greitis padidėja  $0,5 \text{ d}^{-1}$ , lyginant su pastaraisiais rezultatais (Fouilland ir kt. 2018).

Žinoma, patys mikrodumbliai gali būti parazitai, ypač aukštesnio arba to pačio taksonominio rango individams (Goff ir kt. 1987; Sachs ir kt. 2005). Dažnu atveju, raudondumbliai yra laikomi modeliniu parazitu, kurio patogenezės mechanizmas išsamiai ištirtas (Zuccarello ir kt. 2004; Hancock ir kt. 2010). Supaprastinta patogenezės schema prasideda parazitinei sporai prisijungus prie šeimininko audinio/ląstelės. Tuomet sudygusi spora pradeda formuoti trumpą filamentinę giją, kuri skverbiasi gilyn į ląstelę. Filamentui pasiekus branduolį, mitochondriją ir kitas plastides, prasideda intensyvi parazito DNR sintezė bei mitochondrijų dalijimasis. Šeimininko ląstelės paviršiuje susiformavę galai, neįprastos pūslelės, indikuojančios patogenezės proceso vyksmą. Tuo tarpu pūslelių viduje įvykęs lytinis parazitinių ląstelių dauginimasis suformuoja  $2n$  karposporas ar  $1n$  tetrasporas, kurios yra paskleidžiamos į aplinką tolesniam parazitizmo vyksmui (Goff ir kt. 1987; Zuccarello ir kt. 2004; Hancock ir kt. 2010).

Priešinga parazitizmui tarpusavio sąveika – mutualizmas. Šios tarpusavio sąveikos metu abu komponentai patiria abipusę naudą (žr. 1.2. lentelę). Mutualizmo atvejų daugiausiai nustatyta tarp mikrodumblių ir bakterijų (Kim ir kt. 2014; Cho ir kt. 2015; Cooper ir kt. 2015; Yao ir kt. 2019). Viena iš to priežasčių yra dumblių gebėjimas sintetinti organinius junginius ir deguonį, kurie yra būtini bakterijų išgyvenimui. Bakterijos mainais už minėtus junginius mikrodumblius aprūpina sintetinamais bioaktyviaisiais junginiais bei metabolizmo produktais. Vienas iš pavyzdžių – bakterijos dumbliams tiekia organinius ir neorganinius junginius (Teplitski ir kt. 2011). Kitas svarbus mutualistinės sąveikos komponentas – vitaminai.

Nustatyta, jog bakterijos, sintetinančios vit. B<sub>12</sub>, mainais į organinę anglį tiekia mikrodumbliams vitaminus, būtinus aminorūgščių sintezei (Croft ir kt. 2005). Tuo tarpu panaudojant *Escherichia coli* K-12 atviro skaitymo rėmelių plazmidžių rinkinį buvo nustatyta daugiau genų ir jų koduojamų produktų, kurie teigiamai veikia dumblius. Iš 3600 genų buvo atrinkti 32 genai, kurių ekspresija lėmė chlorofilo *a* koncentracijos padidėjimą daugiau nei 1,4 karto. Vienas iš produktyviausiai veikiančių *C. vulgaris* mikrodumblius – riboflaviną koduojantis genas. Šio vitamino teigiamas poveikis atsikartojo, kultivuojant mikrodumblius riboflavinu papildytoje mitybinėje terpėje (Heo ir kt. 2019).

1.2 lentelė. Mikrodumblių ir mikroorganizmų tarpusavio sąveikos pavydžiai, bei poveikio mechanizmas.

Mikrodumbliai	Bakterijos	Sąveikos pobūdis ir veikimo mechanizmas	Šaltinis
<i>Alexandrium tamarense</i>	<i>Alteromonas</i> sp., <i>Thalassobius aestuarii</i> sp.	Parazitizmas. Bakterijų sintetamos β-gliukozidazės ir chitinazės inicijuoja dumblių lizę	(Wang ir kt. 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Rhizobium</i> sp.; <i>Flavobacterium</i> sp.; <i>Hypomonas</i> sp.; <i>Sphingomonas</i> sp.	Mutualizmas. Bakterijos aprūpina mikrodumblius neorganiniais ir mažo molekulinio svorio organiniais junginiais	(Cho ir kt. 2015)
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	Komensalizmas. Bakterijos fiksuoja azotą ir tiekia jį mikrodumbliams	(Hernandez ir kt. 2009)
<i>Dunaliella salina</i>	<i>Alteromonas</i> sp., <i>Muricauda</i> sp.	Mutualizmas. Bakterijos aprūpina mikrodumblius azoto junginiais	(Le Chevanton ir kt. 2013)
<i>Emiliania huxleyi</i>	<i>Phaeobacter inhibens</i>	Mutualizmas. Dumblių sintetamos amino rūgštys (triptofanas) yra prekursoriai bakterijų sintetiniams junginiams (auksinams)	(Segev ir kt. 2016)
<i>Porphyridium purpureum</i>	Bakterijos <i>Halomonas</i> sp.	Mutualizmas. Bakterijos aprūpina mikrodumblius vit. B <sub>12</sub>	(Croft ir kt. 2005)

Be viso to, dumblių fikosferoje aptinkamos bakterijos gali padėti formuoti bioplėveles. Nustatyta, jog bioplėvelėse augančių mikrodumblių tankis yra kur kas didesnis, nei laisvai augančių dumblių. Taip pat tik bioplėvelėse aptinkami bakterijų sintetiniai acilhomoserino

laktonai (AHL) indikuoja kvorumo pojūčio buvimą (Rivas ir kt. 2010). Įrodyta, jog kvorumo pojūčio sistema atlieka svarbų vaidmenį formuojant mikrodumblių bioplėveles bei reguliuojant virulentiškumą, atsparumą antibiotikams ir antrinių metabolitų gamybą (Rivas ir kt. 2010; Zhou ir kt. 2016).

Tačiau nei parazitizmas, nei mutualizmas nėra pastovi tarpusavio sąveika. Besikeičiant abiotiniams ir biotiniams faktoriams tarpusavio sąveika gali kisti (Neuhauser ir kt. 2004; Liu ir kt. 2012). Jau minėta mutualistinė sąveika tarp dumblių išskiriamos organinės anglies ir bakterijų sintetinamų cheminių junginių gali pakisti dėl C ar N prieinamumo. Pavyzdžiui, kultivuojant dumblius su bakterijos fosforo stokojančiomis sąlygomis išsivysto konkurencinis parazitizmas. Būtent tarpusavio sąveikos kitimai leido išskirti dar vieną tarpusavio sąveiką – komensalizmą. Tai tarpusavio sąveika, kai tik vienas iš komponentų patiria teigiamą poveikį. Dažnu atveju sudėtinga identifikuoti komensalizmą. Tačiau Cho ir tyrėjų grupė fikosferoje aptiko komensalistinių bakterijų, kurios besidaugindamos neskatina *C. vulgaris* augimo. Keliamą hipotezę, jog bakterijos naudoja dumblius kaip apsaugą, suteikiančią buveinę ir organinės anglies šaltinį (Cho ir kt. 2015)

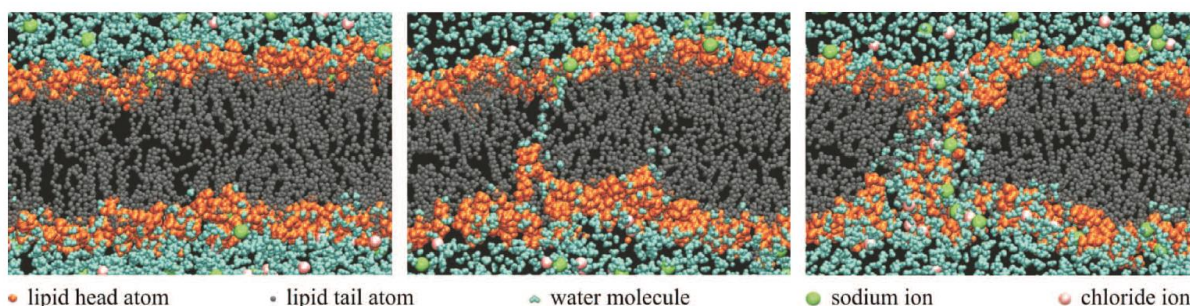
Taigi, mikrodumblių kultivavimas gali būti moduluojamas ne tik kontroliuojant abiotinius, bet ir keičiant biotinius veiksnius. Šiuo metu diegiamos technologijos, kurių metu kultivuojami, mutualistiniu poveikiu pasižymintys mikrodumbliai ir bakterijos (Lebrero ir kt. 2016; Bélanger-Lépine ir kt. 2020; Pascual ir kt. 2020). Tai padidina ne tik gautos biomasės ir/ar sintetinamo produkto kiekį, bet ir sumažina kultivavimo kaštus. Tačiau siekiant likviduoti parazitiniu poveikiu pasižyminčius mikroorganizmus vis dar ieškoma sprendimo būdų, kurie nesukeltų šalutinio poveikio mikrodumbliams. Vienas iš naujausių, selektyvaus mikroorganizmų likvidavimų būdų galėtų būti selektyvi elektropasterizacija (Simonis 2019).

#### 1.4. Impulsinis elektrinis laukas ir jo poveikio pritaikymas

Išorinio elektrinio impulsinio lauko taikymas prokariotinėms ir eukariotinėms ląstelėms, gali sukelti transmembraninio potencialo skirtumus, kurie padidina membranos pralaidumą. Bendrai šis reiškinys vadinamas elektroporacija arba elektropermeabilizacija: jo poveikis palengvina mikro- ir makromolekulių transportą į arba iš ląstelės. Šios technologijos taikymas biomedicinos bei biotechnologijų sektoriuose paskatino naujų maisto produktų apdorojimo, genų terapijos, vaistų transportavimo, vėžio terapijos ir kitų metodų kūrimą (Mahnič-Kalamiza ir kt. 2014; Scheffer ir kt. 2014; Yarmush ir kt. 2014; Rosazza ir kt. 2016; Buchmann ir kt. 2019).

Nepaisant technologijos išplėtojimo ir taikymo masto, molekulinis elektrinio impulsinio lauko poveikio mechanizmas vis dar nėra iki galo ištirtas.

Šiuo metu laikomasi nuomonės, jog elektrinio impulsinio lauko sukeltas transmembraninio potencialo skirtumas abipus membranos inicijuoja vandens molekulių skverbimąsi link hidrofobinės fosfolipidų dvisluoksnio dalies sukeldamas membranoje defektą. Minėtoje struktūroje inicijuojamas membranos fosfolipidų persiorientavimas ir sumažėja molekulių skverbimuisi reikalingos energijos kiekis. Proceso rezultatas – susiformavusi pora (žr. 1.5 pav.). Susiformavusios poros skirstomos į grįžtamasias ir negrįžtamasias. Esminis šių membranos defektų skirtumas – jog grįžtamosios poros bėgant laikui (po kelių minučių) užsiveria, membranos vientisumas atsistato ir ląstelės išlieka gyvybingos. Tuo tarpu negrįžtamos poros stabilizuojasi ir išlieka atviros membranoje. Išnykus membraniniam barjerui sutrinka abipus membranos esantis molekulių balansas, kuris inicijuoja fiziologinius ir morfologinius pakitimus bei ląstelės mirtį (Glaser ir kt. 1988; Weaver ir kt. 1996; Kotnik ir kt. 2012).



1.5 pav. Dinaminė elektroporacijos, vandens porų susiformavimo, schema. Kairėje – lipidų dvisluoksnis prieš elektrinio lauko poveikį. Viduryje – elektrinio lauko poveikio sukeltas vandens molekulių skverbimasis pro membraną ir poros formavimasis. Dešinėje – persitvarkiusi lipidinė membrana suformuoja stabilią porą, pro kurią teka vandens molekulės ir jonai (Kotnik ir kt. 2012).

Nustatyta, jog elektrinio impulsinio lauko poveikio efektyvumas ir taikymas priklauso nuo impulsinio elektrinio lauko parametrų (amplitudės, trukmės, pasikartojimo dažnio, impulsų skaičiaus bei impulsų bangos formos) bei veikiamo objekto savybių (ląstelės dydžio, formos, išorinės membranos sudėties, aplinkos (terpės) laidumo ir kt.) (Kotnik ir kt. 2012; Joannes ir kt. 2015; Cervia ir kt. 2018; Rockenbach ir kt. 2019). Objekto savybių įtaką elektrinio impulsinio lauko poveikiui gerai vizualizuoja bakterijų pavyzdys. Gram-teigiamų, t. y. turinčių storą peptidoglikano sluoksnį, lazdelių formos bacilų bei kokų membranos pralaidumui sukelti reikalingas silpnesnis elektrinis laukas, lyginant su Gram-neigiamomis bakterijomis, turinčiomis papildomą išorinę membraną (Nickoloff 1995). Tačiau, ląstelės dydžio atžvilgiu, mažesnių (1-10  $\mu\text{m}$  dydžio) prokariotinių ląstelių membranos pralaidumo padidėjimui reikalingi žymiai stipresni (10 kV/cm) elektriniai impulsai, nei eukariotinėms augalų ir gyvūnų

ląstelėms (5 kV/cm) (Jarm ir kt. 2015). Taip pat nustatyta, jog didėjanti ląstelių biomasė gali apsunkinti difuzijos procesą, o tai lemia sumažėjusią išskiriamo produkto išeigą (Scherer ir kt. 2019).

Apibendrinant, trumpi (10–1000 ns trukmės) impulsai dažniausiai naudojami norint paveikti eukariotinių ląstelių viduląstelines membranas arba siekiant suformuoti daug grįžtamųjų porų, plazminėje membranoje (Beebe ir kt. 2012; Pakhomov ir kt. 2015). Tuo tarpu mikrosekundiniai (1–1000  $\mu$ s) impulsai gali sukelti neterminę, negrįžtamą įvairių ląstelių permeabilizaciją (Kotnik ir kt. 2015; Rockenbach ir kt. 2019). O ilgi impulsai, trunkantys kelias milisekundes, gali būti naudojami krūvį turinčių molekulių (baltymai, DNR...) transportavimui į ląstelę (Cervia ir kt. 2018).

Elektrinis impulsinis laukas – vienas populiariausių metodų svetimės genetinės medžiagos įvedimui į ląstelę. Nustatyta, jog taikant elektrinius impulsus genų modifikacijoms ir/ ar medžiagų apykaitos inžinerijai, galima pagerinti mikrodumblių vertingų junginių išskyrimą ir sumažinti kultivavimo proceso išlaidas (Kotnik ir kt. 2015). Siekiant padidinti mikrodumblių biomasę sukurti *Nannochloropsis* sp. greitai besidauginantys transformantai, gebantys kaupti didesnę riebalų kiekį, nei įprastai (Kilian ir kt. 2011). Tikimasi, jog greitu metu mikrodumblių transformantai galės būti panaudoti, kaip ekspresijos sistemos, sintetinant žmogiškus terapinius baltymus (Hempel ir kt. 2011; Liu ir kt. 2012; Dyo ir kt. 2018).

Dažnai netinkamas sintetinamo produkto išskyrimo metodas sumažina produkto kiekybinę ir kokybinę išeigą. Viena pagrindinių mikrodumblių produktų išskyrimo procesą apsunkinančių priežasčių yra itin tvirta ląstelės sienelė (Aguirre ir kt. 2013). Šio ląstelinio barjero funkcionalumui sumažinti gali būti taikomi fizikiniai (mechaninis, šiluminis, elektrinis ir kt.) cheminiai, biologiniai metodai ar jų kombinacijos (Gerken ir kt. 2012; Dong ir kt. 2016; Papachristou ir kt. 2020). Manoma, jog ideali dumblių sintetinamų produktų išskyrimo metodika turi būti efektyvi veikiant drėgną dumblių biomasę. Ji lengvai pritaikoma skirtingose kultivavimo skalėse ir nepakenktų ar neužterštų sintetinamų junginių. Taip pat, dėl taikomo išskyrimo metodo mažiau fragmentuotas objektas, palengvina sintetinamų junginių gryninimą (Richmond ir kt. 2013). Būtent elektrinio impulsinio lauko poveikis pasižymi prieš tai išvardintomis savybėmis.

Minėtuoju metodu, padidinus ląstelės sienelės pralaidumą, galima pagerinti dumblių viduje esančių junginių transportavimą iš ląstelės (Kotnik ir kt. 2015; Garoma ir kt. 2016). Ši strategija taikoma siekiant išskirti nepakitusios struktūros aminorūgštis, karotenoidus ar kitus didelės pridėtinės vertės junginius (Mahnič-Kalamiza ir kt. 2014; Luengo ir kt. 2015; Nehmé ir

kt. 2016). Taip pat nustatyta, jog veikiant elektriniam impulsiniam laukui galima išskirti baltymus išsaugant nepakitusį mikrodumblių gyvybingumą (Buchmann ir kt. 2019). Tuo tarpu veikiant stipriais, ilgai trunkančiais elektriniais impulsais galima išskirti daugiau nei 50 % ląstelės viduje esančių baltymų ir 75 % riebalų (Joannes ir kt. 2015; Scherer ir kt. 2019).

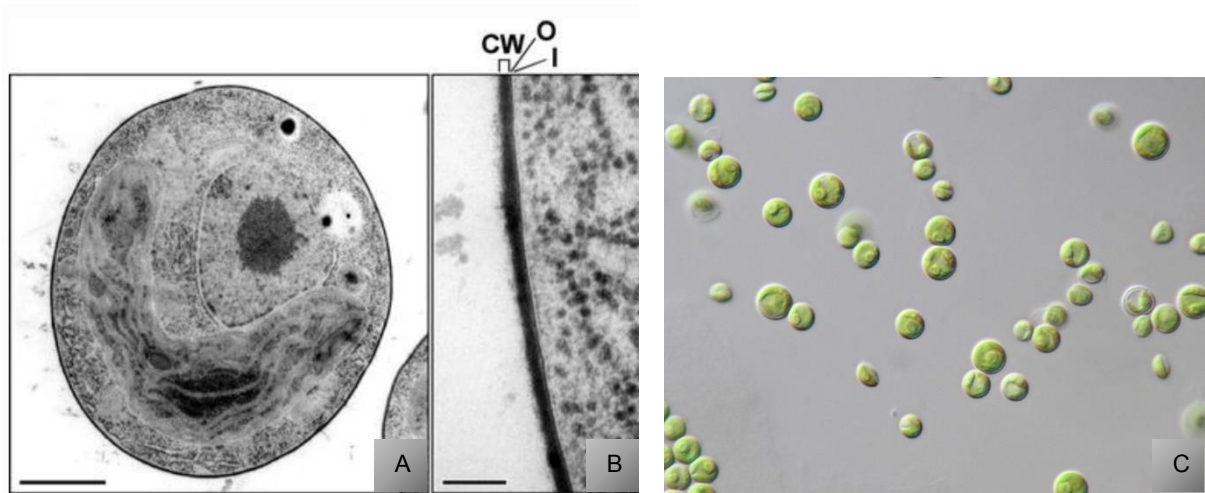
Taigi, elektrinio impulsinio lauko poveikis gali būti plačiai pritaikomas įvairiuose pramonės sektoriuose. Siekiant optimizuoti dumblių kultivavimo sąlygas, galima pasirinkti kelias elektrinio impulsinio lauko poveikio strategijas. Transfekcija tobulinant dumblių genetinę informaciją galima sukurti itin produktyvius, norimomis savybėmis pasižyminčius transformantus. Tuo tarpu veikiant elektriniam laukui didėjantis ląstelės membranos pralaidumas įgalina kontroliuoti mikrodumblių gyvybingumą ir išskiriamų junginių kokybinę ir kiekybinę išėigas. Remiantis selektyvios mielių pasterizacijos rezultatais manoma, jog elektrinis impulsinis laukas gali padėti kontroliuoti dumblių buveinėje esančių mikroorganizmų aktyvumą (Simonis ir kt. 2019). Tai itin svarbus aspektas siekiant optimizuoti produktyvų mikrodumblių kultivavimą.

### 1.5. *Chlorella vulgaris*

Pramoniniu požiūriu, sintetinamų vertingų junginių gausa ir didelis produktyvumas yra esminės kultivuojamų mikrodumblių savybės. Daugelio tyrimų rezultatai įrodė, jog *Chlorella vulgaris* turi didelį potencialą tapti biologinės gamybos platformų dalimi (Liang ir kt. 2009; Phukan ir kt. 2011; Muñoz ir kt. 2018; Suthar ir kt. 2018; Sakarika ir kt. 2019).

*C. vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] 1890 m. aprašytas (AlgaeBase duomenų bazė, žiūrėta: 2020 03 25 15:36) vienaląstis eukariotinis mikroorganizmas aptinkamas gėlo vandens telkiniuose, jūrose ir dirvoje. Jis pasižymi dideliu fotosintetiniu efektyvumu, greita reprodukcija bei gebėjimu augti autotrofinėmis, miksotrofinėmis ir heterotrofinėmis sąlygomis (Borowitzka 2018; Madigan ir kt. 2019).





1.6 pav. *C. vulgaris* ląstelės morfologija. A ir B – TEM nuotrauka (Yamamoto ir kt. 2005), C – šviesinės mikroskopija nuotrauka (CAUP nuotraukų kolekcija, žiūrėta: 2020 03 21 16:00). CW – ląstelės sienelė, O – išorinė membrana, I – vidinė membrana. Mastelis 1  $\mu\text{m}$  (A,B) ir 10  $\mu\text{m}$  (C).

Tai sferinės-elipsoidinės formos 2–10  $\mu\text{m}$  diametro žaliadumblis, turintis panašias į augalo ląstelės struktūrines organeles. Kitaip nei augalai, *C. vulgaris*, vykdydami oksigeninę fotosintezę, didžiąją dalį sugeneruotos energijos panaudoja reprodukcijos procesui (Madigan ir kt. 2019). Nejudrūs *C. vulgaris* dauginasi formuodami nelytines autosporas. Dažnu atveju iš vienos ląstelės suformuoja 2–32 autosporos / dukterinės ląstelės, kurios į aplinką patenka suirus motininės ląstelės sieniei (Yamamoto ir kt. 2003). *C. vulgaris* reprodukcijos rezultatas – itin didelio tankio biomasė, kurios didžiąją dalį, 12–55 %, sudaro angliavandeniai, ypač krakmolos. Nustatyta, jog keičiant kultivavimo sąlygas *C. vulgaris* biomasės sudėtyje esančių junginių, baltymų (43–58 %), riebalų (5–68 %), pigmentų (1–2 %), mineralų kiekis gali kisti (Priyadarshani ir kt. 2012; Yeh ir kt. 2012; Safi ir kt. 2014; Camacho ir kt. 2019; Ru ir kt. 2020).

Iš mikrodumblų, *C. vulgaris* išsiskiria itin tvirta, apsauginę funkciją atliekančia, ląstelės sienie, kurioje įsiterpęs lankstus, lengvai hidrolizuojamas polimerinis matriksas (žr. 1.6 pav.). Nustatyta, jog matriksas, sudarytas iš urono rūgščių, ramnozės, arabinozės, fukozės, ksilozės, manozės, galaktozės ir gliukozės, gali būti visiškai hidrolizuojamas 1 N NaOH arba 2 M trifluoroacto rūgštyje (TFA). Tuo tarpu, tvirta TFA atspari sienelė yra N-acetyl-gliukozamino bei ramnozės, galaktozės, gliukuronoramnano (angl. *glucuronorhamnan*),  $\beta$ 1,3-galaktano ir arabinomanano darinys (Takeda 1991; Ogawa ir kt. 1999; Ogawa ir kt. 2001; Yamamoto ir kt. 2005; Pieper ir kt. 2012). Sienelės tvirtumą lemiantis N-acetyl-gliukozaminas, formuoja į chitiną panašų sluoksnį, kuris yra jautrus chitinazėms ir lizocimams. Taip pat patvirtina, jog  $\beta$ -gliukuronidazė, laminarinazė, sulfatazė, tripsinas mutanolizinas ir proteinazė K geba slopinti *C. vulgaris* augimą (Gerken ir kt. 2012). Be viso to, *C. vulgaris* sienelė iš išorės yra apsupta egzopolisacharido (angl. *exopolysaccharide* (EPS)) sluoksniu. Tai galaktozamino (45,4 %),

gliukozamino (28,0 %) ir manozės (10,6 %) darinys, papildomi apsaugantis nuo antibiotikų, toksiškų metalų bei fagocitozės poveikio (Zhang ir kt. 2019).

Dėl mikrodumblių produktyvumo ir sintetinamų naudingų junginių gausos *C. vulgaris* turi didelį potencialą vykdant tolesnę biotechnologijų plėtrą bei kuriant naujus, didelės pridėtinės vertės produktus (Ru ir kt. 2020). Jau šiuo metu *C. vulgaris* naudojamas kaip maisto ar jo sudedamųjų dalių, vitaminų, mikroelementų šaltinis (Caporgno ir kt. 2018; Ru ir kt. 2020). Tikimasi, jog greitai metu, žaliadumbliai bus naudojami gaminant biokurą bei įvairius farmakologiniu poveikiu pasižyminčius bioaktyvius junginius/vaistus (Phukan ir kt. 2011; Gerken ir kt. 2012; Archanaa ir kt. 2019; Zhang ir kt. 2019). Tačiau prieš pradėdant mikrodumblių industrializaciją būtina optimizuoti kultivavimo bei sintetinamų junginių išskyrimo procesus. Nustatyta, jog kombinuojant skirtingas mikrodumblių kultivavimo sąlygas (biotiniai ir abiotiniai veiksniai) ir elektrinio impulsinio lauko poveikį, galima efektyviai padidinti *C. vulgaris* biomasės produktyvumą ir išskiriamų junginių išėigą (žr. 1.2 lentelę) (Hernandez ir kt. 2009; Mohammad Mirzaie ir kt. 2015; Liang ir kt. 2009; Buchmann ir kt. 2019; Papachristou ir kt. 2020). Tačiau kultivavimo sąlygų kaita lemia *C. vulgaris* fiziologinius ir morfologinius pokyčius. Tuo tarpu pasikeitusi ląstelės sienelės sudėtis bei savybės yra itin svarbūs aspektai norint įvertinti elektrinio impulsinio lauko poveikį.

## 2. TYRIMŲ MEDŽIAGOS IR METODIKA

### 2.1. Mikrodumblių kultivavimas.

Išgrynintas *Chlorella vulgaris* 395 (T. Dempster, ASU, USA dovana) kamienas buvo auginamas skystoje mitybinėje terpėje BG-11, kuri susideda iš  $\text{NaNO}_3$  (150 g/L) 1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (40 g/L) 0,1 %,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (75 g/L) 0,1 %,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (36 g/L) 0,1 %,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$  (6 g/L) +  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O FeH}_3\text{N}$  (6 g/L) 0,1 %, EDTA (1 g/L) +  $\text{BH}_3\text{O}_3$  (2,86 g/L) +  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1,81 g/L) +  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,22 g/L) +  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,39 g/L) +  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,079 g/L) +  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,0494 g/L) 0,1 % ir  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 g/L) 0,1 %. BG-11 terpės elektrinis laidumas 2,3 mS/cm, nustatytas konduktometru (Mettler Toledo, JAV). Visų eksperimentų metu taikytos šios dumblių kultivavimo sąlygos: 21–22 °C temp., nekintantis šviesos šaltinis ( $9,77 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), kurio režimas 16/8 val. (diena/naktis) (Thimijan 1983). Visi eksperimentai buvo atlikti su mikrodumblių ląstelėmis išskirtomis eksponentinės augimo fazės metu.

### 2.2. Bakterijų kultivavimas.

Tyrimuose naudotas *Delftia* sp. kamienas, išskirtas iš *C. vulgaris* 395 kultūros, gryninat serijinių skiedimų metu. Bakterijų auginimo sąlygos bei ląstelių suspensijos paruošimas tyrimams buvo atliekamas standartinėmis sąlygomis. Bakterijos auginamos standžioje TSA (triptono sojų agaras) (VWR International, Austrija) ir skystose TSB (triptono sojos sultinys) (VWR International, Austrija), mitybinėse terpėse. TSB elektrinis laidumas – 13,3 mS/cm. Eksperimentams reikalinga skysta bakterijų suspensija buvo auginama termostatinėje purtyklėje TUO-10-2 ORBITAL SHAKER INCUBATOR (MRC International, Izraelis) (200 rpm 30 °C temp.). Po auginimo nustatytas bakterijų ląstelių kolonijas formuojančių vienetų (KFV) – drumstumo santykis (žr. 1 priedą) (Jackie Reynolds 2011). Visi eksperimentai buvo atlikti su bakterijų ląstelėmis išskirtomis eksponentinės augimo fazės metu.

### 2.3. Bakterijų identifikavimas

Bakterijoms identifikuoti buvo atlikti fenotipiniai ir genotipiniai tyrimai. Fenotipinės analizės metu, vizualiai ir optinio mikroskopo Olympus BX51 (Olympus America Inc., JAV) pagalba, užfiksuotos šios morfologinės savybės: bakterijų ląstelės ir kolonijos forma, spalva, judrumas, gebėjimas formuoti sporas. Taip pat, siekiant nustatyti ląstelės sienelės tipą, bakterijos buvo dažomos Gramo būdu, naudojant komercinį rinkinį (RAL Diagnostics, Prancūzija) ir vadovaujantis gamintojo nurodytu procedūros protokolu.

Genotipinė, 16S rRNR geno sekoskaita atlikta Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Biotechnologijos instituto, DNR sekoskaitos centre. 16S rRNR geno sekoskaitos reakcijoms naudotas sekoskaitos rinkinys BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, JAV), kuris pagrįstas DNR grandinės terminacijos (Sanger-dideoxy)

metodu su fluorescenciškai žymėtais terminatoriais (ddNTP). Gauti nuskaityti 700–900 bazių ilgio kontigai buvo apjungti į bendrą seką DNASTAR – Lasergene EditSeq programinio paketo pagalba. Tolimesnis bakterijų identifikavimas buvo vykdomas naudojantis NCBI Nucleotide BLAST duomenų baze. Daugybinis sekų sugretinimas – palyginys ir filogenetinio medžio (dendrogramos) konstravimas buvo atliktas naudojantis MEGA programiniu paketu. Ląstelių proteomo analizė, priskiriama fenotipinei-genotipinei dichotomijai, atlikta masių spektrometrijos (MALDI-TOF) tyrimo metu. MALDI-TOF tyrimas atliktas Nacionalinės visuomenės sveikatos priežiūros laboratorijoje, naudojant Bruker Microflex™ LRF masių spektrometrijos įrangą. Gauti tyrimo rezultatai apdoroti Bruker Flex Control 3.4 programine įranga ir palyginti su klinikinių mikrobiologinių tyrimų duomenų bazės informacija.

#### 2.4. Mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimų metodika

Dumблиų ir bakterijų tarpusavio sąveikai įvertinti naudotos dvi skirtingos tyrimų metodikos. Pirmo tyrimo metu, įvertinta bakterijų gebėjimas formuoti lizės zonas ant mikrodumблиų gazono. Eksperimento metu naudota sterili, agarizuota (0,75 %) BG-11 dumблиų mitybinė terpė. Išlydyta ir atvėsinta (~40 °C temp.) BG-11 terpė, papildyta *C. vulgaris* mikrodumблиų suspensija (galutinė koncentracija  $1 \times 10^6$  ląstelės/mL), išpilstyta į Petri lėkšteles. Sterilių stiklinių rutuliukų pagalba, lėkštelėje esančioje terpėje, suformuotos dubutės. Sustingus terpei, rutuliukai išimti, o suformuotos dubutės papildytos 300 μL TSB terpe (kontrolinė duobutė) ir TSB terpėje užaugintų bakterijų suspensija (g. k. 0,1, 0,2,  $2 \times 10^6$  KfV/mL) (likusios duobutės). Petri lėkštelės, užsandarintos Parafilm plėvele (Biosigma S.r.l., Italija), inkubuotos 7 dienas standartinėmis dumблиų sąlygomis (žr. 2.1 Mikrodumблиų kultivavimas).

Antro tyrimu metu, *C. vulgaris* mikrodumблиai, kartu su bakterijomis, buvo kultivuojami skystoje BG-11 terpėje. 500 mL Erlenmejerio kolba, pripildyta 200 mL sterilios BG-11 mitybinės terpės, papildyta dumблиų ( $2 \times 10^7$  ląst./mL) ir bakterijų inokuliantu (kiekviena kolba su skirtinga bakterijų koncentracija: 0.1, 0.5, 1, 1.5,  $2 \times 10^6$  KfV/mL) (žr. 2-A priedą). Mikrodumблиų ir bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimas vykdytas 9 dienas, kultivuojant standartinėmis mikrodumблиų sąlygomis (žr. 2.1 Mikrodumблиų kultivavimas). Tyrimo metu buvo fiksuojami šie parametrai: dumблиų terpės optinis tankis, drumstumas ir pH, dumблиų sausa biomasė bei išskirto chlorofilo *a* koncentracija.

##### 2.4.1. Dumблиų optinio tankio vertinimas

Mikrodumблиų terpės šviesos sugertis nustatyta spektrofotometru Halo RB-10 (Dynamica Scientific Ltd., Didžioji Britanija) (680 nm bangos ilgis), naudojant 10mm ilgio polietileningą kiuvetę (Abou-Shanab ir kt. 2011). Optinio tankio matavimo metodika panaudota

sudarant dumblių ląstelių koncentracijos-optinio tankio priklausomybės kalibracinę kreivę (žr. 3 priedą). Dumblių ląstelių koncentracija nustatyta skaičiuojant mikrodumblių ląsteles Goryaevio kameroje (Muntyan ir kt. 2012), naudojant optinį mikroskopą Olympus BX51 (Olympus America Inc., JAV).

#### 2.4.2. Dumblių drumstumo nustatymas

Mikrodumblių terpės drumstumas nustatytas nefelometriu turbidimetru, integruotu į spektrofotometrą, NANOCOLOR VIS II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Vokietija), naudojant 16 mm pločio stiklinį mėgintuvėlį. Drumstumo matavimo metodika panaudota sudarant dumblių ląstelių koncentracijos-drumstumo priklausomybės kalibracinę kreivę (žr. 4 priedą). Dumblių ląstelių koncentracija nustatyta skaičiuojant mikrodumblių ląsteles Goryaevio kameroje (Muntyan ir kt. 2012), naudojant optinį mikroskopą.

#### 2.4.3. Chlorofilo *a* koncentracijos nustatymas

Priklausomai, nuo mikrodumblių biomasės kiekio, 2 arba 4 mL mėginio centrifuguojama 10 minučių, 3000 rpm greičiu, centrifuga SIGMA 1-6P (Sigma-zentrifugen, Vokietija). Mėginio supernatantas pašalinamas, o likusios dumblių nuosėdos suspenduojamos 2 mL etanolio (99.5 %, Merk Emparta® ACS, Vokietija). Gautas mišinys homogenizuotas Vortex Mixer Classic purtyklėje (VELP Scientifica, Sigma-Aldrich, JAV) (10 s, maksimaliu greičiu). Chlorofilo *a* ekstrakcija vykdyta tirpalą inkubuojant 24 val. šaldytuve (+6 °C temp.). Po inkubacijos, tirpalas išimamas iš šaldytuvo ir centrifuguojamas 5 min, 4000 rpm greičiu. Mėginio supernatanto absorbcija nustatyta spektrofotometru (663, 645 ir 630 nm bangos ilgyje), naudojant 10 mm ilgio kvarcinę kiuvetę. Gauti optinio tankio rezultatai perskaičiuoti į chlorofilo *a* koncentraciją, remiantis literatūros šaltinyje nurodyta formule (Henriques ir kt. 2007).

$$C_x = (11,64A_{663} - 2,16A_{645} - 0,1A_{663})v/(lV)$$

$C_x$  – chlorofilo *a* koncentracija (µg chlorofilo/mL terpės),  $A_{xxx}$  – absorbcija esant xxx nm bangos ilgyje,  $v$  – naudoto tirpiklio (etanolio) tūris (mL),  $l$  – spektrofotometrinės kiuvetės ilgis (cm),  $V$  – dumblių mėginio tūris (mL).

#### 2.4.4. Dumblių sausa biomasės nustatymas

Mikrodumblių sausa biomasė gauta vakuuminės filtracijos metu, naudojant 10 CFM dviejų pakopų vakuuminį siurbį (Mastercool Inc., JAV), kolbą su išoriniu šlifą (1000 mL), keraminį piltuvą, su poringu filtro pagrindu ir vakuuminė mova, bei 1,2 µm poros dydžio, 47 mm skersmens stiklo mikropluošto filtrus (Frisenette ApS, Danija). Prieš filtracijos procedūrą, kiekvieno filtro individuali masė nustatyta naudojant analitines svarstykles Explorer® EX124

(OHAUS, JAV). Automatinė pipetė Transferpette (BrandTech Scientific, JAV) paimama 5000  $\mu\text{L}$  dumblių ir/ be bakterijų ląstelių suspensijos ir pernešama ant sudrėkinto filtro. Pastarasis žingsnis kartojamas, kol filtro spalva pasikeičia iš baltos į žalią (žr. 5 priedą). Nufiltravus ląstelių suspensiją, filtras papildomai praplaunamas tokiu pat tūriu dejonizuoto vandens, kuris buvo nufiltruotas. Po filtracijos, filtrai išdžiovinti metalinėje kaitinimo spintoje (80 °C temp., 24 val.) ir pakartotinai pasveriami. Gauta dumblių sausa biomasė apskaičiuota remiantis literatūros šaltinyje nurodyta formule (Kreeger, 1995).

$$\text{Sausa biomasė, g/L} = \frac{A(\text{filtro svoris po filtracijos, g}) - B(\text{filtras prieš filtraciją, g})}{\text{Suspensijos tūris, L}}$$

#### 2.4.5. Mikrodumblių terpės pH vertės nustatymas

Mikrodumblių terpės vandenilio jonų koncentracija nustatyta pH matavimo prietaisu Orion 720Aplus (Thermo Scientific™, JAV), sujungtu su epoksidiniu (plastikiniu) viengubos jungties elektrodu.

#### 2.4.6. Mikrodumblių specifinio augimo greičio apskaičiavimas

Vidutinis specifinis augimo greitis  $\mu$  ( $\text{d}^{-1}$ ) (logaritminis biomasės didėjimas kultivavimo metu) buvo apskaičiuotas remiantis literatūros šaltinyje nurodyta formule (Canelli ir kt. 2020)

$$\mu = \frac{\ln \left( \frac{CDW_2}{CDW_1} \right)}{t_2 - t_1}$$

$CDW_1$  ir  $CDW_2$  – sausa dumblių biomasė (g/L),  $t_1$  ir  $t_2$  – kultivavimo trukmė (dienomis).

### 2.5. Elektrinio impulsinio lauko poveikio, mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai, tyrimų metodika

*C. vulgaris* ir *Delftia* sp. tarpusavio sąveikos pokytis veikiant elektriniu impulsiniu lauku buvo vertinamas keliais etapais. Pirmojo etapo metu, buvo tiriamas elektrinio lauko poveikis mikrodumbliams (žr. 2.5.1. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *C. vulgaris* mikrodumblių gyvybingumui). Antrojo – elektrinio lauko poveikis bakterijų atžvilgiu (žr. 2.5.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumui). Trečiojo tyrimų etapo metu vykdytas mikrodumblių ir bakterijų kultivavimas fotobioreaktoriuose (žr. 2.5.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai).

Visais tyrimų etapais buvo naudojama ta pati elektrinio lauko impulsų generavimo įranga ir kiuvetė, sukurta Fizinių ir technologinių mokslo centre (Stankevic ir kt. 2020). Naudota 400 $\mu\text{L}$  tūrio, kiuvetė pagaminta iš nerūdijančio plieno elektrodų, tarpu kurių tarpas 2 mm.

Elektrinio impulsinio lauko taikymo schema ir parametrai visų tyrimų etapais buvo vienodi. Automatine pipete Transferpette (BrandTech Scientific, JAV) paimama 400µL ląstelių (dumblių/ bakterijų) suspensijos ir perkeliama į kiuvetę. Kiuvetė prijungiama prie elektrinio lauko generavimo įrangos perdavimo linijos. Nustatoma šaltinio  $U$  – įtampa (100, 500, 1000, 2000, 3000 V), stačiakampio elektrinio impulso  $\tau$  – trukmė (10 µs),  $f$  – dažnis (1 Hz) bei  $n$  – impulsų kiekis (1 vnt.). Po elektrinio lauko poveikio ląstelių suspensija išimama ir perkeliama į sterilų mėgintuvėlį. Pastarasis žingsnis atkartojamas keletą kartų, kol gaunamas reikalingas dumblių ir/ ar bakterijų ląstelių suspensijos tūris. Tolimesni veiksmai vykdomi atsižvelgiant į tyrimo etapą. Taikytas elektrinio impulso stipris apskaičiuojamas pagal elektrinio lauko impulsų generavimo įrangoje atvaizduotą amplitudę ir formulę:

$$E = \frac{U_R - I \times 100}{0,1}$$

$E$  – elektrinio impulso stipris (kV/cm),  $U_R$  – reali įtampa (V),  $I$  – elektros srovė (A) (Stankevich 2020)

#### 2.5.1. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *C. vulgaris* mikrodumblių gyvybingumui

Ekspontinėje augimo fazėje išskirtos mikrodumblių ląstelės buvo veikiamos skirtingais impulsiniais elektriniais impulsais, pagal aprašytą veikimo schemą (žr. 2.5. Elektrinio impulsinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai). Po elektrinio lauko poveikio *C. vulgaris* ląstelės serijinių skiedimų metu praskiedžiamos iki ~ 40000 ląst./mL. 10 µL suspensijos perkeliama į Goryaevio kamerą (Muntyan ir kt. 2012), kurioje, naudojant optinį mikroskopą, nustatoma mikrodumblių ląstelių koncentracija. Kontrolei naudojamos elektriniu lauku neveiktos *C. vulgaris* ląstelės.

Taip pat, po elektrinio lauko poveikio *C. vulgaris* ląstelės buvo panaudotos chlorofilo *a* išskyrimui (žr. 2.4.3. Chlorofilo *a* koncentracijos nustatymas). Kontrolei naudojamos elektriniu lauku neveikti mikrodumbliai.

#### 2.5.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumui

Prieš elektrinio lauko poveikį *Delftia* sp. bakterijos šviežiai užauginamos, skystoje TSB mitybinėje terpėje, inkubuojant ~ 15 val. termostatinėje purtyklėje. Po auginimo bakterijų ląstelių suspensija yra centrifuguojama 5 min. 3500 rpm greičiu. Mėginio supernatantas (TSB terpė) pašalinamas, o likusios bakterijos 3 kartus praplaunamos sterilia BG-11 terpe, išmaišant purtyklėje ir centrifuguojant 5 min., 3500 rpm greičiu. Atlikus bakterijų praplovimą, naudojant spektrofotometrą ir 10 mm ilgio polietileningą kiuvetę, *Delftia* sp. ląstelės sukonzentruojamos BG-11 terpėje iki optinio tankio 2. Gauta ląstelių suspensija veikiamą skirtingais elektriniais

impulsais, pagal aprašytą elektrinio impulsinio lauko veikimo schemą (žr. 2.5. Elektrinio impulsinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai). Po elektrinio lauko poveikio *Delftia* sp. ląstelės serijinių skiedimų metu praskiedžiamos iki ~ 6000 KfV/mL. 50 µL suspensijos išsėjama ant standžios PCA terpės Petri lėkštelėje ir auginama inkubatoriuje prie 30 °C temp., 24 val. Po inkubacijos suskaičiuojama išaugusios kolonijos. Kontrolei naudojamos elektriniu lauku neveiktos bakterijos.

### 2.5.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai

Impulsinio elektrinio lauko poveikio dumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai tyrimai buvo atlikti trejose 800 mL burbulų kolonos (angl. *bubble column*) fotobioreaktoriuose (pagaminta pagal užsakymą), kultivuojant *C. vulgaris* mikrodumblius su/ be bakterijų (žr. 2-B priedą). Pirmoji kolba pripildyta 400 mL sterilios BG-11 mitybinės terpės papildyta tik dumblių (g. k.  $2 \times 10^7$  ląst./mL) inokuliantu. Antroji kolba, pripildyta tuo pačiu tūriu sterilios BG-11, papildyta dumblių (g. k.  $2 \times 10^7$  ląst./mL) ir bakterijų (g. k.  $2 \times 10^6$  KfV/mL) inokuliantu. Trečioji – išlaikytos minėtos sąlygos, tik dumblių – bakterijų inokuliantas (koncentracijos nepakitusios), prieš papildant kolbą, buvo veiktas impulsiniu elektriniu lauku ( $E = 10$  kV/cm,  $\tau = 10$  µs,  $f = 1$  Hz,  $n = 1$  vnt.). Tolimesni tarpusavio sąveikos tyrimai vykdyti 7 dienas, kultivuojant standartinėmis, periodinėmis (angl. *batch*<sup>1</sup>) sąlygomis (žr. 2.1. Mikrodumblių kultivavimas) ir aeruojant deguonies ir oro dujų mišiniu. Nuo tyrimo pradžios buvo fiksuojami šie parametrai: dumblių terpės optinis tankis (žr. 2.4.1. Dumblių optinis tankis), chlorofilo *a* konc. (žr. 2.4.3. Chlorofilo *a* koncentracija) dumblių biomasė (žr. 2.4.4. Dumblių sausa biomasė) bei specifinis augimo greitis (žr. 2.4.6. Mikrodumblių specifinio augimo greičio apskaičiavimas).

## 2.6. Statistinė duomenų analizė

Gauti pirminiai eksperimentų rezultatai apdoroti naudojantis duomenų kaupimo ir statistinės analizės Microsoft *Excel 2004* versijos ir *OriginPro8* (OriginLab Corporation, 2007) programiniais paketais. Naudojant aprašomosios statistikos metodą buvo apskaičiuoti gautų kiekybinių požymių vidurkiai, standartinis nuokrypis. Tyrimo duomenų analizės grafikai sudaryti naudojant *OriginPro8* (OriginLab Corporation, 2007) programą. Statistinių duomenų reikšmingumui įvertinti pasirinktas nepriklausomų imčių T-kriterijus (angl. *Independent samples t-test*), leidžiantis nustatyti, ar to paties kintamojo vidurkių skirtumai sugrupuotuose duomenyse, t. y. tarp grupių, yra statistiškai patikimi. Rezultatai buvo laikyti statistiškai reikšmingais, kai  $p < 0,05$ .

---

<sup>1</sup> Periodinė fermentacija skystoje terpėje, kai pradinė koncentracija kinta, nėra papildoma.



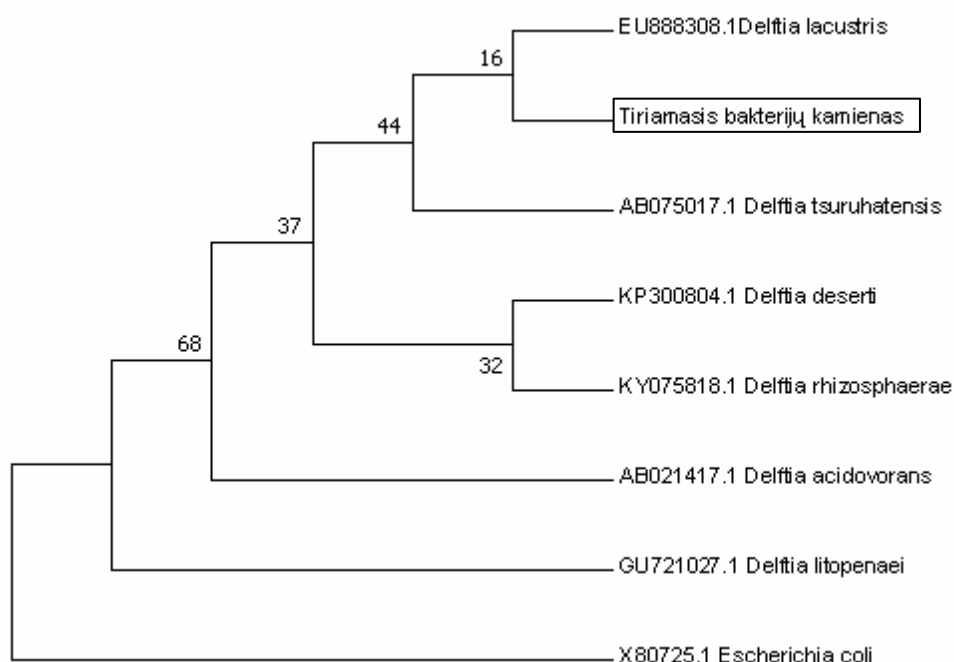
### 3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

#### 3.1. Bakterijų identifikavimas

Atlikus, tyrime analizuojamo bakterijų kamieno, fenotipinę analizę, nustatyta jog ląstelės yra judrios, pavienės, lazdelės formos. Pagal dažymąsi Gramo būdu, ląstelės sienelė yra Gram-neigiama. Kolonijų morfologija ir dydis augimo metu varijuoja. Ankstyvoje augimo stadijoje bakterijų kolonijos labai mažos (kelių milimetrų skersmens), apvalios, perregimos kreminės spalvos. Po 24 val. inkubacijos, pilnai susiformavusios kolonijos yra apvalios, šiek tiek išgaubto, glitaus paviršiaus ir kreminės spalvos. Bakterijoms peržengus stacionarią augimui fazę, kolonijos kraštai segmentuojasi, kol galiausiai lieka tik pėdsakas buvusios kolonijos. Tačiau, šių fenotipinių požymių nepakanka bakterijų identifikavimui. Remiantis šiandieninės mikroorganizmų polifazine taksonomijos strategija, fenotipines savybes būtina papildyti genotipe informacija. Klasikiniai fenotipiniai metodai nėra tinkami nekultivuojamų ir endosimbiontinių bakterijų analizei. Taip pat, siekiant gauti patikimus, atsikartojančius rezultatus, skirtingose laboratorijose, yra būtinas griežtas fenotipinės analizės standartizavimas bei itin kvalifikuoto personalo darbas (Sandle 2016).

Siekiant identifikuoti analizuojamą bakterijų kamieną, atliktas 16S rRNR geno sekvenavimas. Šiuo metu, pastarasis tyrimas yra vienas populiariausių genotipavimo metodų (Parks ir kt. 2018). Šio metodo pripažinimą ir taikomumą lemia 16S rRNR geno ilgis, apie 1500 b.p. seka, egzistencija visų bakterijų tarpe, bei išskirtinė konservatyvių ir hipervariabilių regionų struktūra (Patel 2001; Janda ir kt. 2007; Greay ir kt. 2019). Apjungus gautas 16S rRNR geno sekas į kontigą ir jį palyginus su NCBI Nucleotide BLAST duomenų baze, nustatytas analizuojamo kamieno 80 % panašumas į *Delftia tsuruhatensis* ir *Delftia lacustris* kamienus. Kadangi, analizuojamos sekos panašumas mažesnis nei 98,7 %, buvo atrenkami, filogenetiniu požiūriu artimiausi, *Delftia* genties tipiniai kamienai, kurie vėliau panaudoti filogenetinės medžio (dendogramos) konstravimui (*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN)*, žiūrėta: 2020 01 20 16:21). Dendogramos išaknijimui pasirinkta, filogenetiškai tolima, proteobakterija – *Escherichia coli* (Ópez ir kt. 2017). Atliktas daugybinis sekų sugretinimas bei sukonstruotas filogenetinis medis parodė Nucleotide BLAST rezultatų atsikartojimą. Tiriamasis bakterijų kamienas filogenetiškai mažiausias nutolęs nuo *Delftia lacustris*, kiek tolimiau – *Delftia tsuruhatensis* (žr. 3.1 pav.). Tačiau, atsižvelgus į sekų giminingumo reikšmes, 16 ir 44 atitinkamai su *Delftia lacustris* ir *Delftia tsuruhatensis*, analizuojamo kamieno negalima priskirti nei vienai rūšiai. 16S rRNR geno mažą skiriamąją gebą rūšies lygmenyje lemia polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) pradmenų įvairovės trūkumas ir reakcijos metu susiformuojančios chimerinės sekos. Todėl 16S rRNR geno sekvenavimas tinkamas identifikuoti mikroorganizmus tik genties lygmenyje arba atskirti

artimas bakterijų rūšis (Sandle 2016). Nors *Delftia* sp. bakterijos nebuvo išskirtos iš *C. vulgaris* mikrobiotos, žinoma jog *Delftia* genčiai priskiriami izoliatai yra išskirti iš klinikinių, vandens telkinių bei aktyvuoto dumblo mėginių (Chen ir kt. 2012; Huang 2016; Vásquez-Piñeros ir kt. 2018; Greay ir kt. 2019). Nustatyta, jog minėti izoliatai pasižymi gebėjimu fiksuoti azoto junginius bei degraduoti peptidoglikano sluoksnį ir toksišku dimetilfenolius (angl. *Dimethylphenols*) (Jørgensen ir kt. 2009; Huang 2016; Vásquez-Piñeros ir kt. 2018: 108).



3.1 pav. Analizuojamo bakterijų kamieno filogenetinė dendrograma.

Siekiant papildyti turimą informaciją apie analizuojamo kamieno sistematinę padėtį, buvo atlikta MALDI-TOF analizė. Bruker Flex Control 3.4 programine įranga ir klinikinių mikrobiologinių tyrimų duomenų bazės duomenis, analizuojamas bakterijų kamienas priskirtas *Delftia acidovorans* (2,08) arba *Delftia lacustris* (2,06). Gauti rezultatų įverčiai yra didesni nei 2 ir laikomi labai patikimais. Tikimasi, jog MALDI-TOF, kaip vienas naujausių biocheminių proteomo analizės metodų, tikslumu lenkiantis genotipavimo tyrimus, ateityje pakeis 16S rRNR geno analizę (Ramasamy ir kt. 2014). MALDI-TOF tyrimo metu, matrikse imobilizuota bakterijų kolonija ar jų homogenizatas lazerio pagalba yra suardomas iki molekulių ar jų fragmentų ir jonizuojamas (įgauna krūvį). Šios, krūvį turinčios, dalelės akseleruojamos elektrostatiame lauke ir išmetamos į metalinį skrydžio vamzdelį vakuume, kuriame atsiskiria pagal masės – krūvio santykį. Mažesni jonai greičiau judėdami nei didesni jonai, detektorių pasiekia greičiau. Ši informacija leidžia išsiaiškinti organizmo genome koduojamų baltymų struktūras ir funkcijas, bei nustatyti mikroorganizmų evoliucinį ryšį (Chen ir kt. 2015; Velichko

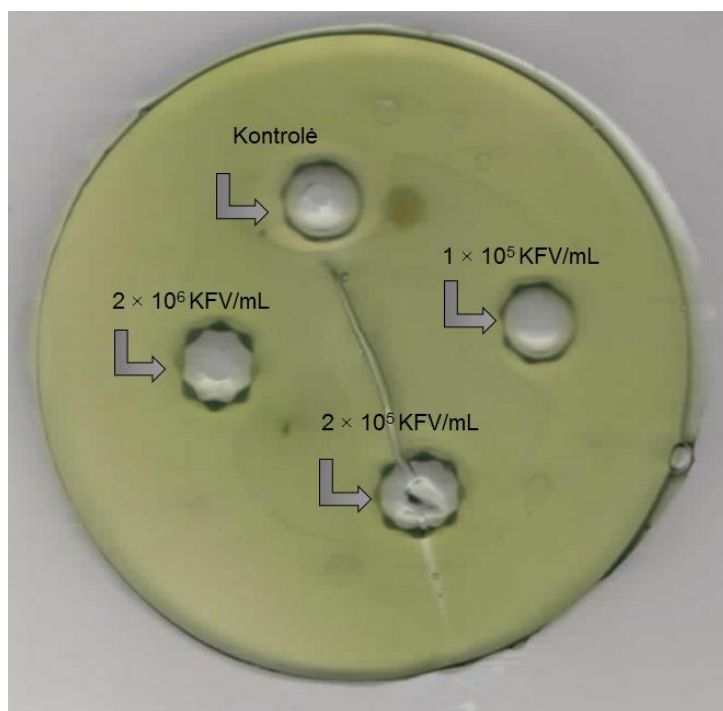
ir kt. 2019). Šiuo metu, visi MALDI-TOF analizės metu identifikuoti *Delftia* sp. kamienai yra išskirti iš klinikinių mėginių (Nashid ir kt. 2016; Ranc ir kt. 2018).

Taigi, atsižvelgus į 16S rRNR geno sekvenavimo, *Delftia* genties tipinių kamienų dendogramą bei MALDI-TOF tyrimo rezultatus, analizuojamą kamieną galima priskirti *Delftia* genčiai. Tačiau, tiriamo kamieno identifikavimui rūšies lygmenyje, būtini papildomi tyrimai.

### 3.2. Mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveika

*C. vulgaris* puikus modelis mikrodumblių, kurio tarpusavio sąveikų su kitais mikroorganizmų nustatyta gausiai (žr. 1.2 lentelę). Tačiau, tarpusavio sąveika tarp *Delftia* sp. bakterijų ir *C. vulgaris* nėra tirta.

Mikroorganizmų tarpusavio sąveikai nustatyti gali būti taikoma daugybė tyrimų metodų. Vienas paprasčiausių, specialios įrangos nereikalaujančių, mikrobiologinių tyrimų, skirtų algicidinių bakterijų nustatymui – lizės zonų formavimas. Mikrodumblių gazonė susiformavusios lizės zonos nurodo bakterijų kilerinį aktyvumą (Aiyar ir kt. 2017; Chen ir kt. 2017).

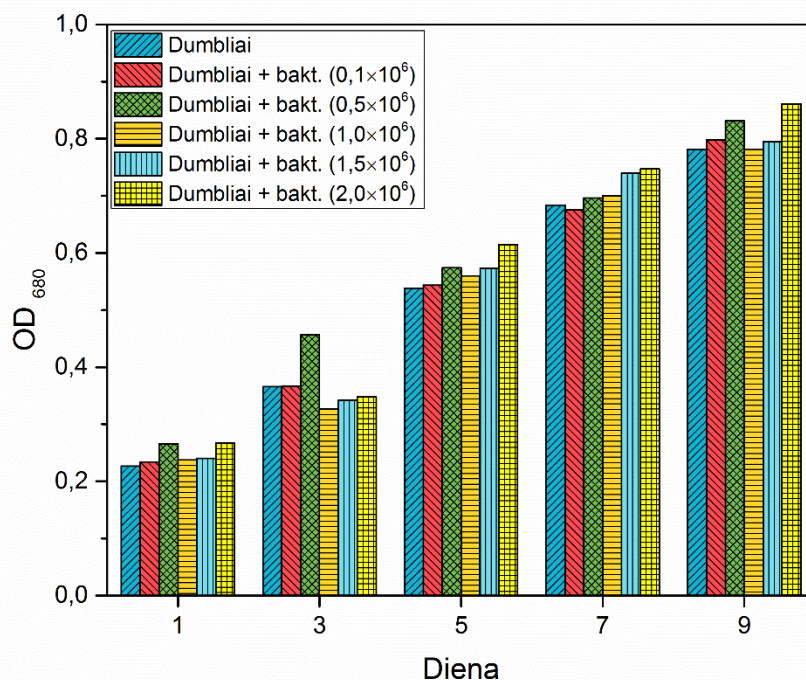


3.2 pav. *C. vulgaris* terpėje formuojamų lizės zonų tyrimas su *Delftia* sp. bakterijomis.

Atlikus lizės zonų formavimosi tyrimą su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis, agarizuotame mikrodumblių gazonė lizės zonų nebuvo užfiksuota (žr. 3.2 pav.). Duobutės sienelės, papildytos bakterijų suspensija, buvo kur kas intensyvesnės žalios spalvos, lyginant su kontrole. Taigi, šie rezultatai nurodo, jog analizuojamas *Delftia* sp. kamienas nepasižymi algiciniu poveikiu, *C. vulgaris* atžvilgiu. Nustatyta, jog *Delftia* sp.,

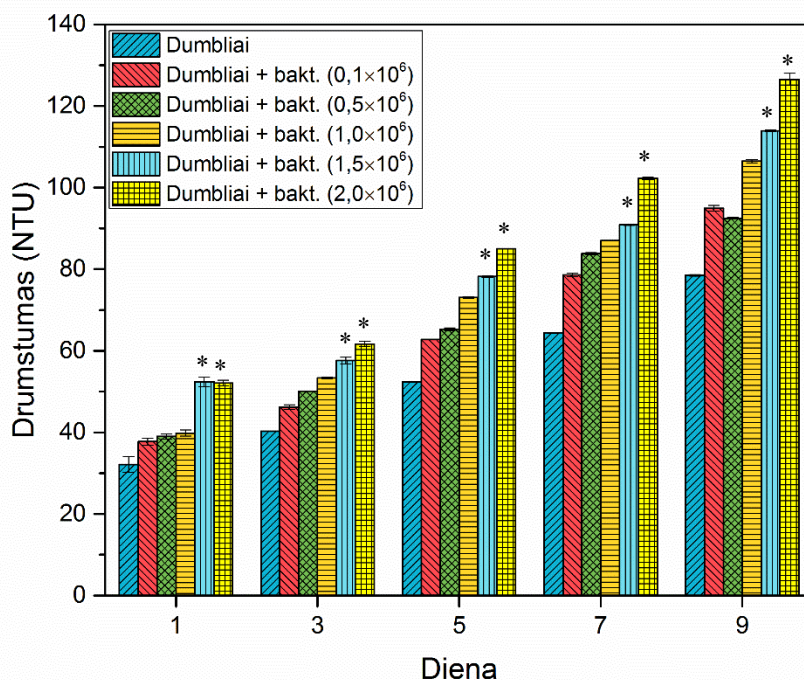
priskiriamos  $\beta$ -proteobakterijoms, geba degraduoti įvairias organines medžiagas (aniliną, linuroną ir kt.) bei redukuoti toksiškus  $\text{Se}^{+4}$  ir  $\text{Cr}^{+6}$  junginius. Be viso to, dėl fiksuojamo azoto, sintetinamų fitochormonų ir geležį surišančių sideroforų, *Delftia* sp. priskiriamos prie augalų augimą skatinančių rizobakterijų (Ubalde ir kt. 2012; Hou ir kt. 2015). Remiantis literatūros šaltiniais ir atlikto tyrimo rezultatais, galima iškelti hipotezę, jog *Delftia* sp. bakterijos pasižymi ne tik augalų bet ir mikrodumblių augimą skatinančiu poveikiu (Ubalde ir kt. 2012; Hou ir kt. 2015).

Siekiant detaliai nustatyti tarpusavio sąveiką tarp *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. buvo atliktas mikroorganizmų kultivavimas kartu, įprastomis dumblių augimo sąlygomis (žr. 2-A priedą). Mikrodumblių biomasė yra pagrindinis augimo indikatorius, rodantis dumblių metabolizmo aktyvumą, kintant aplinkos sąlygoms. Biomasė gali būti įvertinta tiesioginiais ir netiesioginiais matavimo metodais. Spektrofotometru įvertinus dumblių terpės absorbcija (680 nm bangos ilgyje) ir palyginus su ląstelių koncentracijos-optinio tankio kalibracine kreive (žr. 3 priedą), netiesioginiu būdu, nustatytas mikrodumblių ląstelių koncentracijos kitimas kultivavimo metu (žr. 3.3 pav.). Gauti rezultatai rodo, jog dumblių optinis tankis, eksponentinėje augimo fazėje, tarp skirtingų kolbų, kinta netolygiai. Kontrolinio bei mažiausiomis bakterijų koncentracijomis papildytų mėginių ( $0,1$  ir  $0,5 \times 10^6$  KFV/mL) vidutinis optinis tankis buvo didesnis  $\sim 16\%$ , nei likusių mėginių. Tuo tarpu tolygus visų mėginių optinio tankio kitimas užfiksuotas *C. vulgaris* stacionaraus augimo fazėje. Lyginant didžiausią bakterijų koncentraciją turintį mėginį ( $2 \times 10^6$  KFV/mL) su kontroliniu, 9 dieną užfiksuotas dumblių optinio tankio padidėjimas  $\sim 9\%$ . Atlikus statistinių duomenų reikšmingumo įvertinimą,  $p$  reikšmė  $> 0,05$  nustatyta lyginant kontrolinį mėginį su likusiais mėginiais (žr. 3.1 lentelę).



3.3 pav. Eksperimento metu nustatytas *C. vulgaris* optinio tankio pokytis, kultivuojant mikrodumblius su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis (KFV/mL).

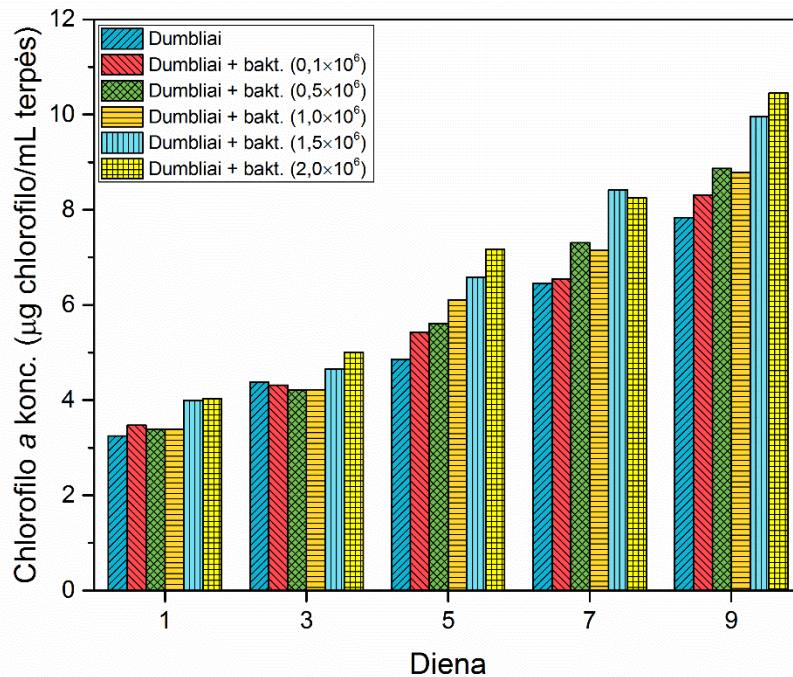
Siekiant patvirtinti *Delftia* sp. bakterijų inokulianto įtaką dumblių biomasės augimui, buvo įvertintas dumblių terpės drumstumo pokytis (žr. 3.4 pav.). Tai dar vienas metodas leidžiantis netiesiogiai nustatyti dumblių biomasę, pasinaudojant ląstelių koncentracijos-drumstumo kalibracine kreive (žr. 4 priedą). Atlikto tyrimo rezultatai rodo, jog mikrodumblių terpės drumstumas tolygiai didėja bėgant laikui ir yra kur kas intensyvesnis mėginiuose papildytuose *Delftia* sp. inokuliantu. Lyginant stacionarios augimo fazės rezultatus, 7-9 dienomis, didžiausias drumstumas užfiksuotas mėginyje ( $2 \times 10^6$  KFV/mL), kuris vidutiniškai didesnis ~ 31 %, nei kontroliniame mėginyje. Šį drumstumo skirtumą patvirtina statistinių duomenų reikšmingumo įvertinimas.  $p$  reikšmė  $< 0,05$  gauta, lyginant kontrolinį mėginį su didžiausiais ( $1,5$  ir  $2 \times 10^6$  KFV/mL) bakterijų koncentracijas turinčiais mėginiais (žr. 3.1 lentelę). Tuo tarpu lyginant kontrolinį mėginį su likusiais, gauta  $p$  reikšmė  $> 0,05$ .



3.4 pav. Eksperimento metu nustatytas *C. vulgaris* terpės drumstumo pokytis, kultivuojant mikrodumblius su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijos (KFV/mL). \* =  $p < 0,05$ .

Tačiau, pastaraisiais netiesioginiais biomasės nustatymo metodais, negalima visiškai pasikliauti. To priežastis – matavimo metodų trūkumai. Tiek spektrofotometru nustatyta terpės šviesos absorbcija, tiek turbidimetru išmatuotas drumstumas, gali kisti ne tik dumbliams augant. Gali būti, jog mėginių, papildytų *Delftia* sp. inokuliantu, absorbcijos ir drumstumo padidėjimas yra sukeltas besidauginančių bakterijų.

Siekiant patikrinti *C. vulgaris* biomasės augimą, išvengiant galimai besidauginančių bakterijų, buvo nustatytas chlorofilo *a* koncentracijos pokytis, bėgant laikui (žr. 3.5 pav.). Atlikus tyrimą, išskirto chlorofilo *a* koncentracija patvirtino pastarųjų tyrimų rezultatus. Ankstyvoje eksponentinėje augimo fazėje, užfiksuotas netolygus chlorofilo *a* koncentracijos pokytis. Tačiau, tiek eksponentinėje tiek stacionarioje augimo fazėje,  $1,5$  ir  $2 \times 10^6$  KFV/mL mėginiai išsiskiria didesne pigmento koncentracija, nei kontrolinis. Vertinant stacionarioje fazėje gautus rezultatus, 7-9 dienomis, mėginyje su didžiausia bakterijų koncentracija ( $2 \times 10^6$  KFV/mL), vidutinė chlorofilo *a* konc. buvo  $9,35 \mu\text{g/mL}$ . Tuo tarpu kontroliniame mėginyje pigmento koncentracija –  $7,42 \mu\text{g/mL}$ . Tačiau, lyginant visus *Delftia* sp. bakterijomis papildytus mėginius su kontroliniu, gauta  $p > 0,05$  (žr. 3.1 lentelę).

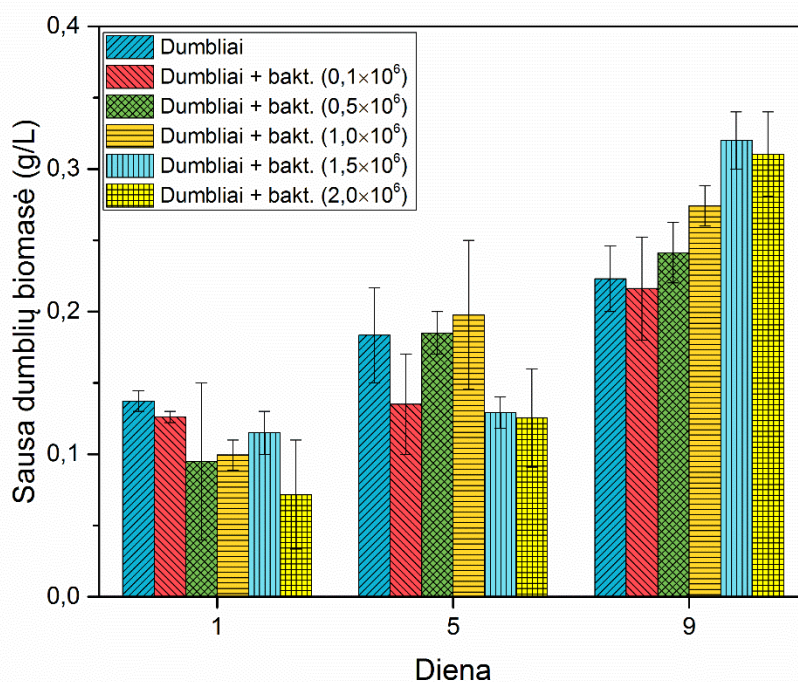


3.5 pav. Eksperimento metu išskirto chlorofilo *a* koncentracijos pokytis, kultivuojant mikrodumblis su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis.

Žinoma, jog tyrimo metu analizuojamas žaliadumblis, išsiskiria itin didele chlorofilo *a* koncentracija. Šis parametras gali indikuoti ne tik mikrodumblių metabolizmo, fotosintezės aktyvumą bet ir netiesioginį biomasės kiekį (Mohammad Mirzaie ir kt. 2015; Toyama ir kt. 2018). T. Toyama ir tyrėjų grupė nustatė, jog kultivuojant grynus *C. vulgaris* mikrodumblis, standartinėmis periodinėmis sąlygomis, chlorofilo *a* ir *b* koncentracija nustoja augti stacionarioje augimo fazėje, maždaug 6 dieną. Tuo tarpu, kultivuojant tuos pačius mikrodumblis, 7 dienas, nuotekų vandenyje, gausiame dumblių augimą skatinančių bakterijų (DASB), chlorofilo koncentracija didėjo toliau (Toyama ir kt. 2018). Tuo tarpu, šiame darbe išskirta *C. vulgaris* chlorofilo *a* koncentracija vidutiniškai padidėjo 26 %, lyginant  $2 \times 10^6$  KfV/mL mėginį su kontroliniu. Pastarieji rezultatai patvirtinta, jog *Delftia* sp. bakterijos pasižymi teigiamu, *C. vulgaris* augimą skatinančiu poveikiu.

Siekiant patvirtinti gautus netiesioginius mikrodumblių biomasės matavimų rezultatus, dumblių biomasė buvo nustatyta tiesioginiu būdu (žr. 3.6 pav.). Eksponentinėje augimo fazėje nustatyta sausos biomasės kiekio netolygus kitimas, koreliuoja su atliktų tyrimų rezultatais. 5 dieną, didžiausi biomasės kiekiai nustatyti kontroliniame bei  $0,5 \times 10^6$  KfV/mL ir  $1 \times 10^6$  KfV/mL mėginiuose. Tuo tarpu vertinant mėginiuose esančios didėjančios bakterijų koncentracijos atžvilgiu, biomasės tolygus kitimas užfiksuotas tik stacionarioje augimo fazėje. Beveik visuose mėginiuose, išskyrus  $0,1 \times 10^6$  KfV/mL, nustatytas biomasės kiekis, 9 dieną,

buvo didesnis 0,018-0,096 g/L, nei kontrolėje. Vis dėlto, gautų rezultatų  $p$  reikšmė viršijo 0,05 vertę (žr. 3.1 lentelę).



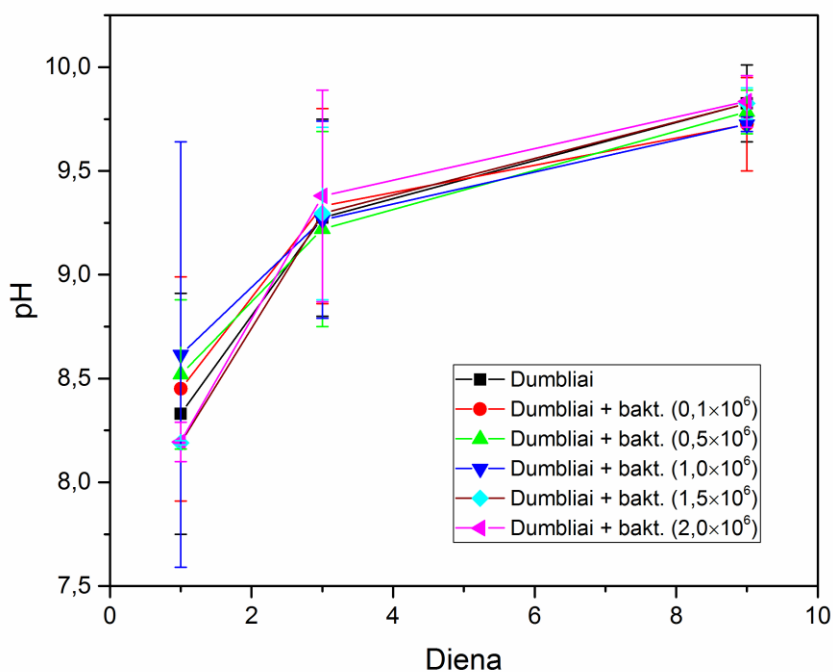
3.6 pav. Eksperimento metu nustatyta *C. vulgaris* sausa biomasa, kultivuojant su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis.

Remiantis T. Toyama atlikto tyrimo duomenimis, nustatyta *C. vulgaris* biomasa padidėjo 1,8-2,8 karto, kultivuojant nuotekų vandenyje, gausiame DASB (Toyama ir kt. 2018). Tuo tarpu kultivuojant *C. vulgaris* su didžiausiomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis (1,5 ir  $2 \times 10^6$  KfV/mL), nustatytas biomasės padidėjimas siekė 1,3-1,4 karto, lyginant su kontrolinio mėginio, 9 dienos, rezultatais. Tačiau, gauti rezultatai nenurodo ar, tarpusavio sąveikos metu, teigiamą poveikį patiria tik dumbliai. Pastarajam teiginiui patikrinti atlikti papildomi tyrimai.

Siekiant nustatyti *Delftia* sp. bakterijų sąveikos pobūdį su *C. vulgaris*, buvo įvertinta dumblių terpės pH vertės kitimas (žr. 3.7 pav.). Tai vienas iš būdų patikrinti heterotrofinių bakterijų dalyvauja anglies biocheminiame cikle. Iš gautų rezultatų, sudėtinga išskirti kardinalius terpės pH pokyčius. Dumbliai augimui peržengus eksponentinę augimo fazę, stebimas minimalus terpės pH padidėjimas, mėginiuose papildytuose bakterijų inokuliantu. Tačiau,  $p$  reikšmė  $> 0,05$  indikuoja, jog gauti rezultatai nėra patikimi. Žinoma, jog heterotrofinės bakterijos dalyvaudamos anglies biocheminiame cikle, organinę anglį verčia į neorganinę (Bai ir kt. 2015). Įprastomis sąlygomis, neorganinė anglis yra dumblių augimą ribojantis veiksnys. Intensyvaus mikrodumblių metabolizmo/ augimo metu, neorganinės

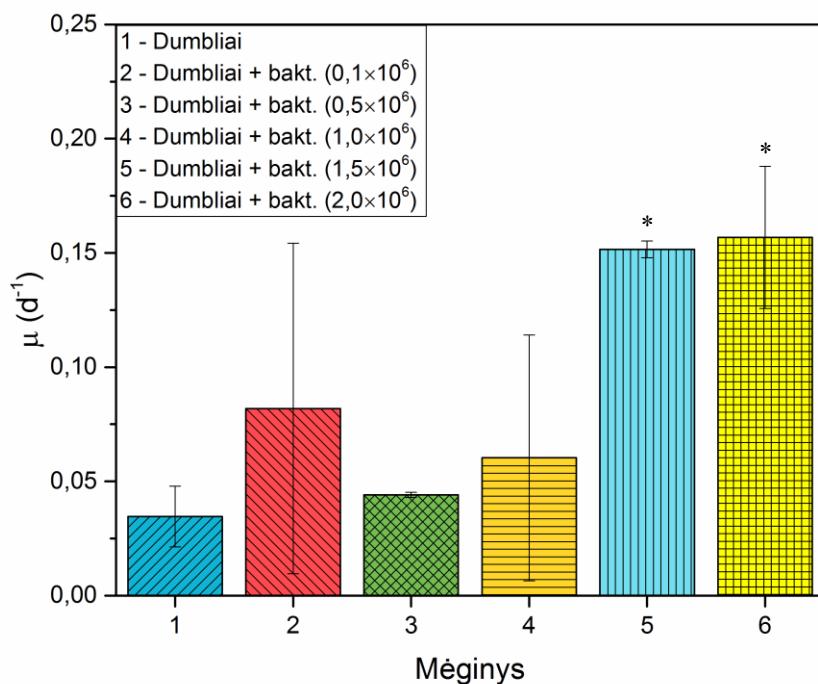


anglies koncentracija terpėje mažėja, kas lemia pH vertės padidėjimą. Tuo tarpu sulėtėjus metabolizmui arba esant anglies trūkumui, pH vertė yra žemesnė (Liu ir kt. 2016). Siekiant patikrinti *Delftia* sp. bakterijų dalyvavimą anglies cikle reikalinga atlikti papildomus tyrimus, kurių metu būtų užfiksuotas tiesioginis ištirpusios neorganinės anglies kiekis, kultivuojant *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. kartu ir atskirai (Bai ir kt. 2015).



3.7 pav. Eksperimento metu nustatyta *C. vulgaris* terpės pH, kultivuojant mikrodumblius su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis (KFV/mL).

Apžvelgiant į visų tyrimų rezultatus, galima teigti jog *Delftia* sp. bakterijos pasižymi teigiamu, *C. vulgaris* mikrodumblių augimą skatinančiu poveikiu. Šią išvadą patvirtina apskaičiuotas stacionarios fazės specifinis augimo greitis (žr. 3.8 pav.). Mėginių papildytų didžiausiomis bakterijų koncentracijomis ( $1, 5$  ir  $2 \times 10^6$  KFV/mL) greitis buvo didesnis  $0,116$ - $0,122$   $d^{-1}$ , nei kontrolinio mėginio. Žinoma, jog *C. vulgaris* didžiausias specifinis augimo greitis, laboratorinėmis sąlygomis, gali pasiekti  $0,278$   $d^{-1}$ , kultivuojant Bold Basal mitybinėje terpėje (Wong 2017). Tuo tarpu kultivuojant *C. vulgaris* uždaruose fotobioreaktoriuose, kartu su geriamo vandens mikrobiota, specifinis augimo greitis gali padidėti iki  $2,0$   $d^{-1}$  (Lakaniemi ir kt. 2012). Tačiau, *Delftia* sp. bakterijų įtaka *C. vulgaris* augimo skatinimui nėra tirta. Šio tyrimo metu apskaičiuotas specifinis greitis rodo, jog kultivuojant mikrodumblius su didesnėmis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis ( $1, 5$  ir  $2 \times 10^6$  KFV/mL),  $\mu$  pagreitinėja beveik 4 kartus, lyginant su kontrolinio mėginio greičiu.



3.8 pav. Eksperimento metu nustatytas, stacionarios augimo fazės specifinis *C. vulgaris* augimo greitis ( $\mu$ ), kultivuojant mikrodumblius su skirtingomis *Delftia* sp. bakterijų koncentracijomis (KFV/mL). \* =  $p < 0,05$ .

Remiantis atliktais mikrodumplių ir bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimais, manoma jog šiame darbe nustatytas *Delftia* sp. bakterijų teigiamas poveikis, *C. vulgaris* atžvilgiu, gali būti nepastovus. Šiuo metu, nustatyta daugelio biotinių ir/ ar abiotinių veiksnių įtaka, galinti sukelti tarpusavio sąveikos kaitą (Neuhauser ir kt. 2004; Liu ir kt. 2012). Tačiau, impulsinio elektrinio lauko poveikis mikrodumplių ir bakterijų tarpusavio sąveikai, dar nėra tyrinėtus.

3.1 lentelė Mikrodumplių ir bakterijų tarpusavio sąveikos tyrimų statistinių duomenų reikšmingumo įvertinimas, stacionarioje augimo fazėje.

	0,1 × 10 <sup>6</sup> KFV/mL	0,5 × 10 <sup>6</sup> KFV/mL	1 × 10 <sup>6</sup> KFV/mL	1,5 × 10 <sup>6</sup> KFV/mL	2 × 10 <sup>6</sup> KFV/mL
Optinis tankis	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Drumstumas	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Chlorofilas <i>a</i>	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Sausa biomasė	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
pH vertė	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Specifinis augimo greitis	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

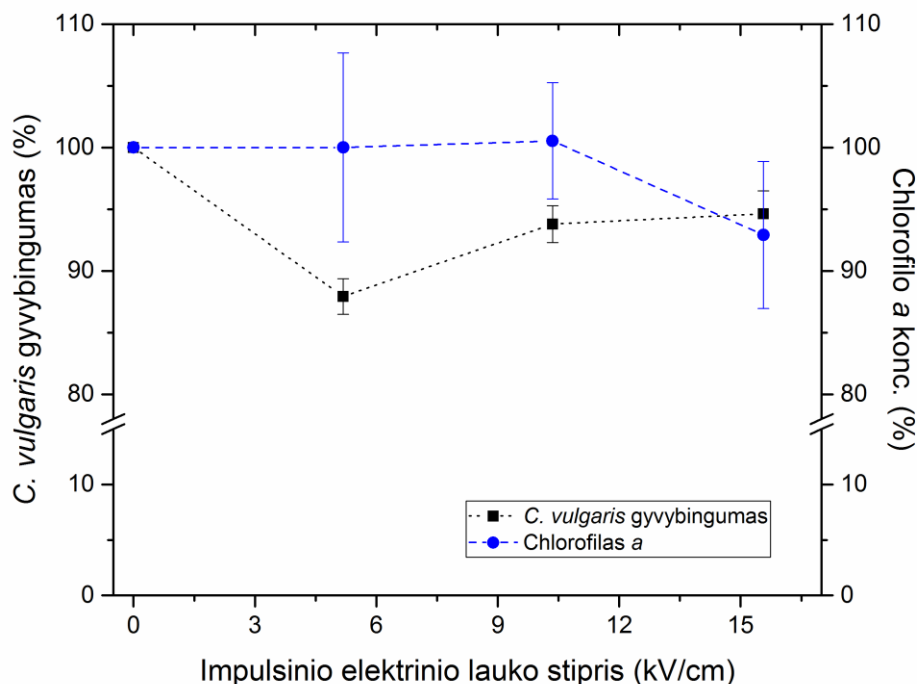
### 3.3. Elektrinio impulsinio lauko poveikis, mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai

#### 3.3.1. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *C. vulgaris* mikrodumblių gyvybingumui

Žinoma, jog elektrinio impulsinio lauko poveikio efektyvumą ir taikymą lemia elektrinio lauko parametrai bei veikiamo objekto savybės (Kotnik ir kt. 2012; Joannes ir kt. 2015; Cervia ir kt. 2018; Rockenbach ir kt. 2019). Būtent pastarojo veiksnio įtaka, skirtinga *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. ląstelių forma ir dydis, paskatino įvertinti elektrinio lauko poveikį kiekvienam tarpusavio sąveikos komponentui individualiai.

Siekiant įvertinti šiame tyrime taikomų elektrinių laukų poveikį, buvo nustatytas gyvybingų *C. vulgaris* skaičius, prieš ir po veikimo elektriniais impulsais. Iš gautų rezultatų galima pastebėti, jog elektrinio lauko poveikis galimai inicijuoja mikrodumblių gyvybingumo sumažėjimą iki 88 %,  $p > 0,05$  (žr. 3.9 pav.). Tačiau, didėjant elektrinio lauko stipriui, mažėjančio dumblių gyvybingumo tendencijos nebelieka. Veikiant 10-16 kV/cm elektriniu lauku mikrodumblių gyvybingumas sumažėja tik ~ 5 %. Nežymaus dumblių gyvybingumo sumažėjimą indikuoja ir statistinis duomenų reikšmingumas.  $p < 0,05$  nustatyta tik lyginant mėginį, veiktą 10 kV/cm elektriniu impulsu, su kontrole. Žinoma, jog *C. vulgaris* negrįžtamą elektropermeabilizaciją gali sukelti stiprūs (20-40 kV/cm) elektriniais impulsais (Luengo ir kt. 2014). Tuo tarpu sukeliant inicijuoti membranos pralaidumo padidėjimą, taikomi elektriniai impulsai, kurio  $E = 10-15$  kV/cm,  $\tau = 3$   $\mu$ s,  $n = 25$  vnt. (Luengo ir kt. 2015). Bendrai, šie impulsai yra žymiai stipresni, lyginant su kitų prokariotinių ir eukariotinių ląstelių membranos pralaidumui sukelti (Kotnik ir kt. 2015). Viena pagrindinių to priežasčių – itin tvirta, sunkiai degraduojama *C. vulgaris* ląstelės sienele.

Tačiau, impulsinio elektrinio lauko poveikis gali sukelti ne vien ląstelės lizę. Žinoma, jog trumpi, silpni elektriniai impulsai gali paspartinti ląstelės fluoroforų molekulių įsisavinimą ar kitų ląstelinių junginių išsiskyrimą į aplinką (Kotnik ir kt. 2015; Garoma ir kt. 2016; Batista Napotnik ir kt. 2018). Siekiant įvertinti šiame tyrime taikomų elektrinių laukų poveikį viduląstelinių junginių išsiskyrimui, buvo nustatyta chlorofilo *a* konc. prieš ir po elektrinio lauko poveikio (žr. 3.9 pav.). Gautų rezultatai rodo, jog taikant iki 10 kV/cm elektrinio stiprio impulsus, išskirto pigmento koncentracija kinta minimaliai (paklaida  $\pm 6$  %). Tuo tarpu taikant stipresnius nei 10 kV/cm elektrinio stiprio impulsus, pigmento koncentracija sumažėja  $7 \pm 5$  %, lyginant su kontrole. Atlikus statistinę duomenų analizę, nustatyta  $p > 0,05$ , lyginant išskirto pigmento koncentraciją prieš ir po elektrinio lauko poveikio.



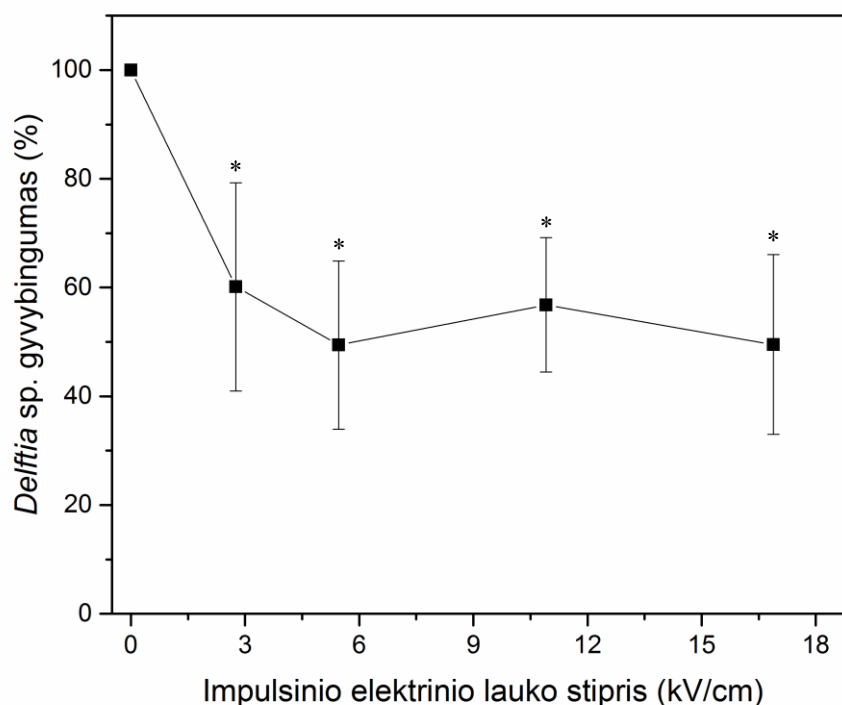
3.9 pav. Eksperimento metu nustatytų *C. vulgaris* gyvybingumo ir išskirto chlorofilo a koncentracijos pokytis, elektrinio impulsinio lauko poveikyje.  $\tau = 10 \mu\text{s}$ ,  $f = 1\text{Hz}$ ,  $n = 1$  vnt.

Soto-Sierra ir tyrėjų komanda yra nustačiusi, jog veikiant vienkartiniais elektriniais impulsais ( $E = 6,25 \text{ kV/cm}$ ,  $\tau = 1 \text{ ms}$ ) chlorofilo ir luteino ekstrakcija gali padidėti atitinkamai 5,2 ir 2,2 karto, negu elektriniu lauku neveiktų dumblių (Soto-Sierra ir kt. 2018). Kita vertus, žinoma, jog išskiriamo chlorofilo koncentracija gali sumažėti dėl apsunkėjusios difuzijos, augant dumblių biomasei (Scherer ir kt. 2019).

Taigi, remiantis literatūros šaltiniais, išskirto chlorofilo bei dumblių gyvybingumo tyrimais, manoma, jog veikiant skirtingais elektriniais impulsais *C. vulgaris* gyvybingumas išlieka nepakitęs.

### 3.3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumui

Prieš įvertinant elektrinių laukų įtaką *Delftia* sp., bakterijų suspensija perkelta į BG-11 terpę. Perkėlimas į mažesnio elektrinio laidumo terpę, leido užtikrinti elektrinio impulso tekėjimą per ląsteles, o ne terpę. Po veikimo silpnu elektriniu lauku ( $E = 3 \text{ kV/cm}$ ), nustatytas tikslus gyvybingų kolonijas formuojančių vienetų (KFV) kiekis rodo bakterijų gyvybingumo sumažėjimą beveik 40 % (žr. 3.10 pav.). Tuo tarpu stiprėjant elektrinio lauko stipriui, bakterijų gyvybingumas viršija 50 % ribą. Bakterijų gyvybingumo sumažėjimą patvirtina apskaičiuota  $p$  reikšmė, neviršijanti 0,05.



3.10 pav. Impulsinio elektrinio lauko poveikis *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumui.  $\tau = 10 \mu\text{s}$ ,  $f = 1\text{Hz}$ ,  $n = 1$  vnt., 1 dieną, \* =  $p < 0,05$ .

Nors elektrinio lauko poveikis *Delftia* sp. bakterijoms iki šiol nebuvo tirtas, Tian ir tyrėjų komanda yra įvertinusi elektrinių impulsų poveikį, gerai žinomų, mikroorganizmų atžvilgiu. Nustatyta, jog *E. coli*, *Staphylococcus aureus* negrįžtama elektroporacija gali būti inicijuota veikiant  $\sim 10$  kV/cm elektriniais impulsais. Šis, bakterijų inaktyvacijai, reikalingas energijos kiekis gali būti sumažinamas padidinus terpės elektrinį laidumą (Tian ir kt. 2017; Wang ir kt. 2019).

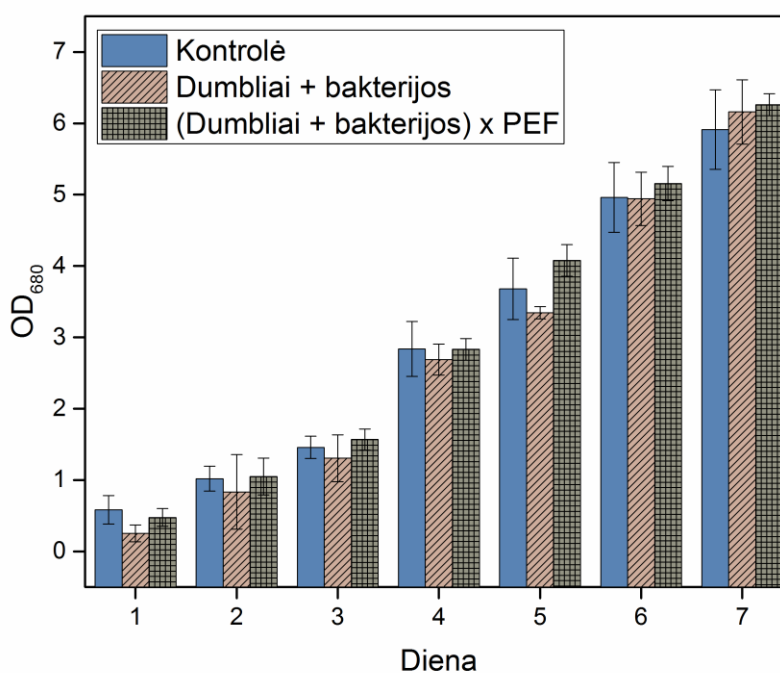
Taigi, apibendrinant bakterijų gyvybingumo tyrimo rezultatus, galima teigti, jog *Delftia* sp. bakterijos yra itin jautrios elektrinio impulsinio lauko poveikiui. Veikiant 3-16 kV/cm elektriniais impulsais bakterijų gyvybingumas vidutiniškai sumažėja  $53 \% \pm 15\%$ .

### 3.3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikai

Nustačius individualių mikroorganizmų gyvybingumo pokytį, veikiant skirtingais elektrinio lauko impulsais, manoma, jog *C. vulgaris* gyvybingumas išlieka nepakitęs. Tuo tarpu *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumas – sumažėja  $\sim 50\%$ . Tačiau, nėra žinoma ar impulsinio elektrinio lauko poveikis, *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. bei jų tarpusavio sąveikos atžvilgiu, pasikeis kultivuojant mikroorganizmus kartu.

Siekiant išsiaiškinti elektrinio lauko poveikį, *C. vulgaris* ir *Delftia* tarpusavio sąveikai, mikroorganizmai buvo kultivuojami fotobioreaktoriuje kartu. Tyrimo metu, kultivavimas vyko 3 fotobioreaktoriuose. Pirmajame fotobioreaktoriuje buvo kultivuojama kontrolinis *C. vulgaris* mėginys. Antrajame – *C. vulgaris* papildytas, didžiausiu teigiamu poveikiu pasižymėjusiu, *Delftia* sp. inokuliantu ( $2 \times 10^6$  KfV/mL). Trečiajame – *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. veikta, statistiškai reikšmingiausiu poveikiu pasižymėjusiu, impulsiniu elektriniu lauku, kurio  $E = 10$  kV/cm,  $\tau = 10 \mu\text{s}$ ,  $n = 1$  vnt.

Kultivavimo metu buvo užfiksuojamas netiesioginis biomasės indikatorius – terpės optinis tankis (žr. 3.11 pav.). Gauti rezultatai rodo, jog eksponentinėje augimo fazėje antrojo ir trečiojo fotobioreaktorių optinis tankis kinta netolygiai. Trečiajame fotobioreaktoriuje optinis tankis, 2-6 dienomis, vidutiniškai buvo didesnis 15 %, negu antrajame. Tačiau, stacionarioje augimo fazėje, antrojo ir trečiojo fotobioreaktorių optinių tankių skirtumas suvienodėja, lieka ~2 %.

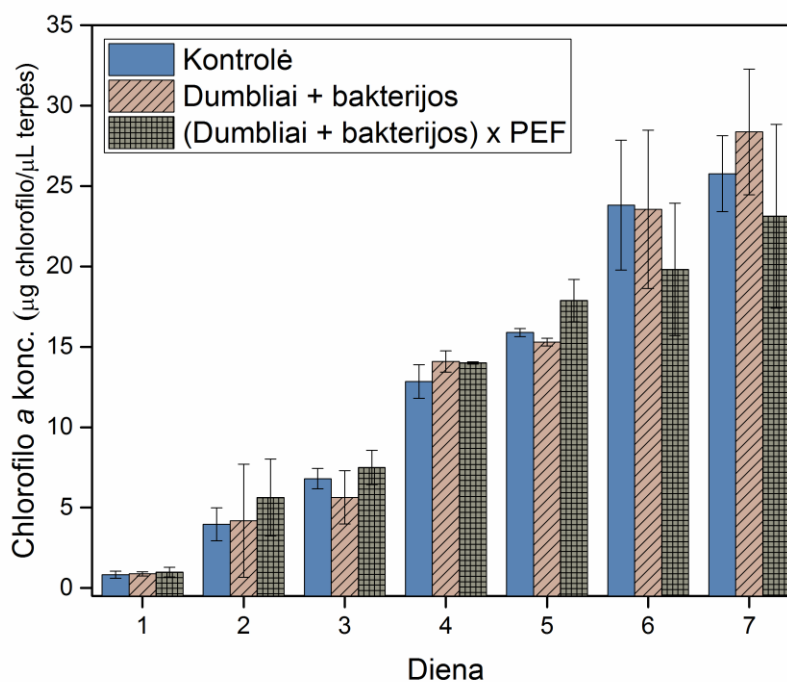


3.11 pav. Impulsinio elektrinio lauko poveikis (PEF) *C. vulgaris* optinio tankio kitimui, kultivuojant mikrodumblisius su *Delftia* sp. bakterijomis.  $E = 10$  kV/cm,  $\tau = 10 \mu\text{s}$ ,  $f = 1\text{Hz}$ ,  $n = 1$  vnt.

Tuo tarpu vertinant stacionarios augimo fazės kontrolinio ir antrojo fotobioreaktorių rezultatus, užfiksuotas beveik 5 % didesnis optinis tankis antrajame fotobioreaktoriuje (su *Delftia* sp. inokuliantu), negu kontroliniame. Tačiau, lyginant kontrolinį su trečiuoju fotobioreaktoriumi, 5 % didesnis optinis tankis nustatytas elektriniu lauku veiktame mėginyje

(trečiajame fotobioreaktoriuje). Apskaičiuota statistinių duomenų patikimumo reikšmė  $p$  viršijo 0,05.

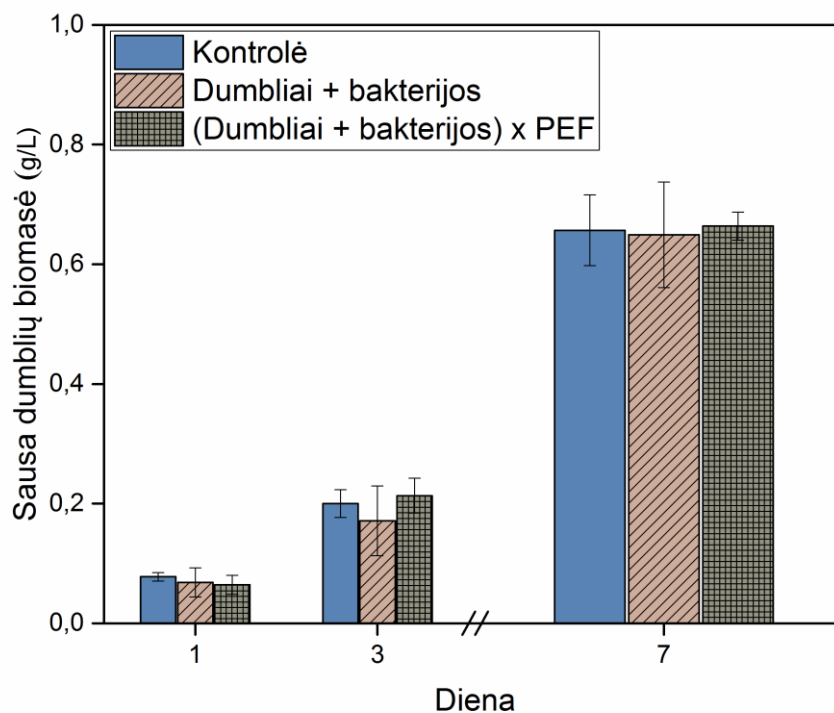
Vertinant išskirto chlorofilo  $a$  koncentraciją, užfiksuotas netolygus pigmento koncentracijos didėjimas, tarp skirtingų fotobioreaktorių (žr. 3.12 pav.). Ekspontinėje augimo fazėje, 2-5 dienomis, trečiajame fotobioreaktoriuje išskirto chlorofilo koncentracija buvo atitinkamai didesnė 18 % ir 20 %, lyginant su kontroliniu ir antruoju fotobioreaktoriais. Tuo tarpu stacionarioje augimo fazėje, 6-7 dienomis, antrajame fotobioreaktoriuje stebimas chlorofilo  $a$  konc. padidėjimas 4 %, lyginant su kontroliniu. Tačiau, trečiajame fotobioreaktoriuje pigmento koncentracija atitinkamai sumažėjo 18 % ir 10 % lyginant su antruoju ir kontroliniu fotobioreaktoriu. Apskaičiuota statistinių duomenų patikimumo reikšmė  $p$  viršijo 0,05. Pastarasis chlorofilo  $a$  konc. sumažėjimas gali būti siejamas su elektrinio impulsinio lauko gebėjimu mažinti, dumblių biomasės augimą skatinančių, *Delftia* sp. baterijų gyvybingumą.



3.12 pav. Impulsinio elektrinio lauko poveikis (PEF) išskirto chlorofilo  $a$  koncentracijos kitimui, kultivuojant mikrodumblis su *Delftia* sp. bakterijomis.  $E - 10$  kV/cm,  $\tau - 10$   $\mu$ s,  $f - 1$  Hz,  $n - 1$  vnt.

Įvertinus tiesioginį mikrodumblių biomasės kitimą, nustatyti skirtumai tarp bioreaktorių yra minimalūs,  $p > 0,05$  (žr. 3.13 pav.). Ekspontinės augimo fazės metu, 3 dieną, trečiajame fotobioreaktoriuje nustatyta sausa biomasė buvo atitinkamai didesnė 6 % ir 24 %, lyginant su kontroliniu ir antruoju fotobioreaktoriais. Tuo tarpu stacionarioje augimo fazėje, 7 dieną, antrajame fotobioreaktoriuje stebimas biomasės sumažėjimas 2 %, lyginant su kontroliniu.

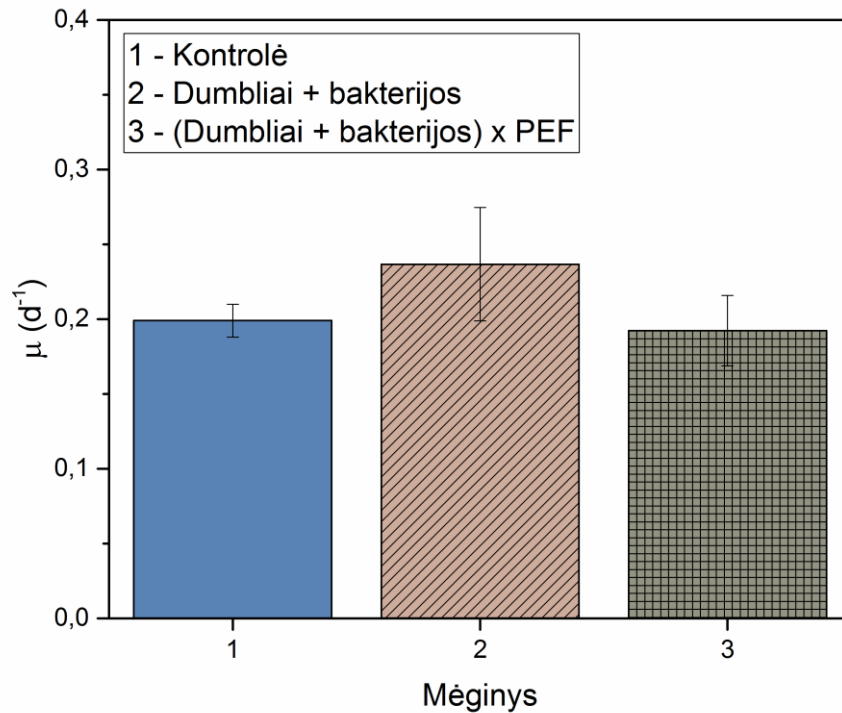
Tačiau, trečiajame fotobioreaktoriuje – atitinkamai biomasė padidėjo 1 % ir 2 % lyginant su kontroliniu ir antruoju fotobioreaktoriumi. Apskaičiuota statistinių duomenų patikimumo reikšmė  $p$  viršijo 0,05.



3.13 pav. Impulsinio elektrinio lauko poveikis (PEF) *C. vulgaris* sausa biomasės kitimui, kultivuojant mikrodumblis su *Delftia* sp. bakterijomis.  $E = 10$  kV/cm,  $\tau = 10$   $\mu$ s,  $f = 1$  Hz,  $n = 1$  vnt.

Tuo tarpu apskaičiuotas, 7 dienos, specifinis mikrodumblių augimo greitis, atkartojo optinio tankio ir chlorofilo *a* konc., stacionarios augimo fazės, kitimų tendenciją (žr. 3.14 pav.). Antrajame fotobioreaktoriuje augančių *C. vulgaris* dumblių greitis atitinkamai buvo didesnis 18 % ir 23 % nei kontrolinio ir trečiojo fotobioreaktorių. Tuo tarpu trečiojo – specifinis augimo greitis mažesnis ~4 % lyginant kontrolinio fotobioreaktoriaus. Apskaičiuota statistinių duomenų patikimumo reikšmė  $p$  viršijo 0,05.





3.14 pav. Impulsinio elektrinio lauko poveikis (PEF) stacionarios augimo fazės specifiniam *C. vulgaris* augimo greičio ( $\mu$ ) kitimui, kultivuojant mikrodumblius su *Delftia* sp. bakterijomis.  $E - 10 \text{ kV/cm}$ ,  $\tau - 10 \text{ }\mu\text{s}$ ,  $f - 1\text{Hz}$ ,  $n - 1 \text{ vnt}$ .

Taigi, apibendrinant gautus tyrimo rezultatus, galima išskirti kelis esminius mikrodumblių ir bakterijų tarpusavio sąveikos bruožus ir jų pokytį impulsinio elektrinio lauko poveikyje. Visų pirma, gauti rezultatai patvirtinto *Delftia* sp. bakterijų gebėjimą teigiamai skatinti *C. vulgaris* biomasės augimą. Antrajame fotobioreaktoriuje, stacionarios augimo fazės metu, užfiksuotas optinio tankio, išskirto chlorofilo *a* ir specifinio augimo greičio padidėjimas atitinkamai 5 %, 4 % ir 18%. Tačiau, pastebėta, jog kultivavimas fotobioreaktoriuose, drastiškai sumažino teigiamo poveikio raišką. Tai gali būti siejama su terpės papildomu aeravimu, CO<sub>2</sub> ir oro dujų mišiniu. Žinoma, jog autotrofinio kultivavimo metu, pagrindinis mikrodumblių neorganinės anglies šaltinis yra CO<sub>2</sub> dujos. Tuo tarpu tyrimų metu tiekiamas neorganinės anglies šaltinis, padidino mikrodumblių augimo greitį 0,0799 d<sup>-1</sup> arba 1,5 karto, kuris lėmė biomasės skirtumų tarp bioreaktorių sumažėjimą. Taip pat, tiekiamos dujos, galimai, sumažino *Delftia* sp. dalyvavimą anglies biocheminiame cikle, kas lėmė sumažėjusį teigiamą poveikį, *C. vulgaris* atžvilgiu.

Antra, impulsiniu elektriniu lauku veikto *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. bakterijų konsorciumo chlorofilo *a* konc. bei  $\mu$  buvo 18 % ir 23 % mažesni nei antrojo fotobioreaktoriaus. Šiam fenomenui paaiškinti reikalingi papildomi, išsamesni tyrimai. Tačiau, remiantis literatūros šaltiniais ir gautais tyrimų rezultatais, žinoma, jog mažesnių (1-10  $\mu\text{m}$  dydžio) bakterinių

ląstelių membranos pralaidumo padidėjimui reikalingas didesnis energijos kiekis (10 kV/cm), lyginant su eukariotinių augalų ir gyvūnų (5 kV/cm) (Jarm ir kt. 2015). Tačiau, tyrime analizuojamų *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumas, veikiant 10 kV/cm elektriniais impulsais, vidutiniškai sumažėja  $44 \% \pm 12 \%$ . Tuo tarpu, itin tvirtą, sunkiai degraduojamą ląstelės sienelę turinčių, *C. vulgaris* negrįžtamai elektroporacija sukelti reikalingi stiprūs (20-40 kV/cm) elektriniais impulsais (Luengo ir kt. 2014; Scherer ir kt. 2019). Veikiant mikrodumblius 10 kV/cm elektriniais impulsais, gyvybingumas išlieka nepakitęs. Žinant šiuos esminius faktorius, galima iškelti hipotezę, jog veikiant mikrodumblių ir bakterijų konsorciumą vienkartiniais 10 kV/cm elektrinio stiprio impulsais ( $\tau = 10 \mu\text{s}$ ), inicijuoja *Delftia* sp. gyvybingumo sumažėjimą. Teigiamo, biomasės augimą skatinančio, poveikio praradimas lemia sumažėjusį *C. vulgaris* kiekį, nei kultivuojant įprastomis sąlygomis, be bakterijų.

## IŠVADOS

- Erlenmejerio kolboje kultivuojamų *C. vulgaris* biomasė gali būti padidinta 40 %, papildžius mikrodumblis *Delftia* sp. bakterijų inokuliantu.
- Veikiant *C. vulgaris* skirtingais stačiakampiais elektriniais impulsais ( $E = 1, 5, 10, 16 \text{ kV/cm}$ ,  $\tau = 10 \text{ } \mu\text{s}$ ,  $n = 1 \text{ vnt.}$ ) mikrodumblių gyvybingumas nekinta.
- Minėtų skirtingų elektrinių impulsų poveikyje, *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumas sumažėja iki  $44 \% \pm 12 \%$ .
- $10 \text{ kV/cm}$ ,  $10 \text{ } \mu\text{s}$  trukmės vienkartinių elektrinių impulsų poveikyje *Delftia* sp. bakterijų išgyvenamumas sumažina mikrodumblių *C. vulgaris* specifinį augimo greitį 18 %, nei kultivuojant mikrodumblis su *Delftia* sp. be elektrinio lauko poveikio.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS  
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

SANTRAUKA

Kamilė Jonynaitė

*Chlorella vulgaris* mikrodumblių ir *Delftia* sp. bakterijų tarpusavio santykių pokyčiai, impulsinio elektrinio lauko poveikyje

Mikrodumbliai – dideliu produktyvumu ir sintetinamų junginių gausa pasižymintis modelinis mikroorganizmas, kurio svarba biotechnologijų, maisto, farmacijos ir energetikos pramonės sektoriuose tampa vis didesnė. Siekiant patenkinti mikrodumblių ir jų sintetinamų junginių poreikį bei prieinamumą, vykdomas kultivavimo proceso optimizavimas. Vienas iš būdų, efektyviai sumažinti proceso kaštus ir skatinti mikrodumblių augimą – naudoti teigiamu poveikiu pasižyminčius mikroorganizmus. Žinoma, jog tarprūšinę tarpusavio sąveiką galima moduluoti keičiant biotinius ir abiotinius kultivavimo faktorius. Tačiau, impulsinio elektrinio lauko poveikis, tarpusavio sąveikų atžvilgiu, nėra tirtas.

Taigi, siekiant išsiaiškinti tarprūšinių tarpusavio santykių pokyčius, impulsinio elektrinio lauko poveikyje, tyrimo objektu pasirinkti *Chlorella vulgaris* mikrodumbliai ir *Delftia* sp. bakterijos. Pirmame tyrimo etape, vykdamas minėtų mikroorganizmų kultivavimą kartu, nustatyta, jog *Delftia* sp. bakterijos pasižymi teigiamu, *C. vulgaris* biomasės augimą skatinančiu poveikiu.

Antrajame – nustatytas individualius mikroorganizmų gyvybingumo pokytis, veikiant skirtingais elektrinio lauko impulsais. Remiantis gautais rezultatai, užfiksuotas drastiškas *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumo sumažėjimas. Tuo tarpu *C. vulgaris* – išliko beveik nepakitęs.

Trečiajame tyrimo etape, *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. bakterijų kultivavimas vyko fotobioreaktoriuose. Statistiškai reikšmingiausias mikrodumblių biomasės pokytis nustatytas elektrinio impulso poveikyje  $E = 10 \text{ kV/cm}$ ,  $\tau = 10 \text{ } \mu\text{s}$ , kuris galimai, selektyviai mažina *Delftia* sp. bakterijų gyvybingumą. Atitinkamai, teigiamu poveikiu pasižyminčių bakterijų sumažėjimas, lėmė *C. vulgaris* biomasės lėtesnį augimą, nei kultivuojant mikrodumblius su *Delftia* sp. be elektrinio lauko poveikio.

## SUMMARY

Kamilė Jonynaitė

### The Influence of Pulsed Electric Field Treatment on Specific Interaction Between *C. vulgaris* and *Delftia* sp. Bacteria

Microalgae is a model microorganism distinguished by its high productivity and its high-value synthesized compounds, which are becoming more and more significant to biotechnology, food, pharmaceutical and energy industry sectors. To meet the rising demand and the accessibility for microalgae and its synthesized valuable compounds, optimization of its cultivation process is essential. The use of microorganisms with positive affect can be one of the most effective ways of reducing the cost and improving the growth rate of microalgae. It is known that interspecific interactions can be modulated by alteration of biotic and abiotic cultivation conditions. However, the influence of pulsed electric field to interspecific interactions has not been examined yet.

Therefore, in order to examine the changes of interspecific interactions under the influence of pulsed-electric-field treatment, *Chlorella vulgaris* microalgae and *Delftia* sp. bacteria were selected. In the first stage of the research, when co-cultivating the above mentioned microorganisms, it was determined that the presence of *Delftia* sp. bacteria positively affected the growth rate of *C. vulgaris* biomass.

In the second stage, the influence of pulsed-electric-field treatment on microorganism viability individually was determined. Based on the outcome of the experiment, a radical decrease of *Delftia* sp. viability is registered. Meanwhile, *C. vulgaris* viability remained undamaged.

In the third stage of the research – *Chlorella vulgaris* and *Delftia* sp. were cultivated in photobioreactors. Most relevant changes of algae biomass were detected after exposure to electric field pulse  $E = 10 \text{ kV/cm}$ ,  $\tau = 10 \text{ }\mu\text{s}$  which likely indicate selective reduction of the viability in *Delftia* sp. bacteria. Therefore, the reduction in bacteria with a positive effect, determined the lower growth rate of *C. vulgaris* algae biomass, other than co-cultivation of microalgae and *Delftia* sp. not under the influence of an electric field.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abou-Shanab R.A.I., Matter I.A., Kim S.-N., Oh Y.-K., Choi J., Jeon B.-H. 2011. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake, *Biomass and Bioenergy* 35(7): 3079–3085. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.04.021 .
- Aguirre A.-M., Bassi A. 2013. Investigation of biomass concentration, lipid production, and cellulose content in *Chlorella vulgaris* cultures using response surface methodology, *Biotechnology and Bioengineering* 110(8): 2114–2122. DOI: 10.1002/bit.24871 .
- Aiyar P., Schaeme D., García-Altare M., Flores D.C., Dathe H., Hertweck C., Sasso S., Mittag M. 2017. Antagonistic bacteria disrupt calcium homeostasis and immobilize algal cells, *Nature Communications* 8(1): 1–13. DOI: 10.1038/s41467-017-01547-8 .
- Alekseyenko T.V., Zhanayeva S.Ya., Venediktova A.A., Zvyagintseva T.N., Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Korolenko T.A. 2007. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk sea *Fucus evanescens* brown alga, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 143(6): 730–732. DOI: 10.1007/s10517-007-0226-4 .
- Ali S.A.M., Razzak S.A., Hossain M.M. 2015. Apparent kinetics of high temperature oxidative decomposition of microalgal biomass, *Bioresource Technology* 175: 569–577. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.109 .
- Álvarez-Díaz P.D., Ruiz J., Arbib Z., Barragán J., Garrido-Pérez M.C., Perales J.A. 2017. Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production, *Algal Research* 24: 477–485. DOI: 10.1016/j.algal.2017.02.006 .
- Amin S.A., Parker M.S., Armbrust E.V. 2012. Interactions between Diatoms and Bacteria, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76(3): 667–684. DOI: 10.1128/MMBR.00007-12 .
- Archana S., Jose S., Mukherjee A., Suraishkumar G.K. 2019. Sustainable Diesel Feedstock: a Comparison of Oleaginous Bacterial and Microalgal Model Systems, *BioEnergy Research* 12(1): 205–216. DOI: 10.1007/s12155-018-9948-6 .
- Bai X., Lant P., Pratt S. 2015. The contribution of bacteria to algal growth by carbon cycling, *Biotechnology and Bioengineering* 112(4): 688–695. DOI: 10.1002/bit.25475 .
- Balabanova L., Slepchenko L., Son O., Tekutyeva L. 2018. Biotechnology Potential of Marine Fungi Degrading Plant and Algae Polymeric Substrates, *Frontiers in Microbiology* 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01527 [Žiūrėta balandžio 2, 2020].
- Barros A., Pereira H., Campos J., Marques A., Varela J., Silva J. 2019. Heterotrophy as a tool to overcome the long and costly autotrophic scale-up process for large scale production of microalgae, *Scientific Reports* 9(1): 1–7. DOI: 10.1038/s41598-019-50206-z .
- Batista Napotnik T., Miklavčič D. 2018. In vitro electroporation detection methods – An overview, *Bioelectrochemistry* 120: 166–182. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.12.005 .
- Becker E.W. 2007. Micro-algae as a source of protein, *Biotechnology Advances* 25(2): 207–210. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.11.002 .

- Beebe S.J., Chen Y.-J., Sain N.M., Schoenbach K.H., Xiao S. 2012. Transient Features in Nanosecond Pulsed Electric Fields Differentially Modulate Mitochondria and Viability, *PLOS ONE* 7(12): e51349. DOI: 10.1371/journal.pone.0051349 .
- Bélangier-Lépine F., Lemire-Lamothe M., Tremblay A., Rondeau S., Marchand P., Huot Y., Barnabé S. 2020. Cultivation of an Algae-Bacteria Consortium in a Mixture of Industrial Wastewater to Obtain Valuable Products for Local Use, *Industrial Biotechnology* 16(1): 33–42. DOI: 10.1089/ind.2019.0011 .
- Bell W., Mitchell R. 1972. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products, *The Biological Bulletin* 143(2): 265–277. DOI: 10.2307/1540052 .
- Borowitzka M.A. 2018. Biology of Microalgae *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7 [Žiūrėta gegužės 7, 2020].
- Bowman C. 2019. *Plant Virology* Scientific e-Resources.
- Bramucci A.R., Case R.J. 2019. Phaeobacter inhibens induces apoptosis-like programmed cell death in calcifying *Emiliania huxleyi*, *Scientific Reports* 9(1): 5215. DOI: 10.1038/s41598-018-36847-6 .
- Buchmann L., Brändle I., Haberkorn I., Hiestand M., Mathys A. 2019. Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts, *Bioresource Technology* 291: 121870. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121870 .
- Camacho F., Macedo A., Malcata F. 2019. Potential Industrial Applications and Commercialization of Microalgae in the Functional Food and Feed Industries: A Short Review, *Marine Drugs* 17(6). DOI: 10.3390/md17060312 [Žiūrėta kovo 27, 2020].
- Canelli G., Neutsch L., Carpine R., Tevere S., Giuffrida F., Rohfritsch Z., Dionisi F., Bolten C.J., Mathys A. 2020. *Chlorella vulgaris* in a heterotrophic bioprocess: Study of the lipid bioaccessibility and oxidative stability, *Algal Research* 45: 101754. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101754 .
- Caporgno M.P., Mathys A. 2018. Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits, *Frontiers in Nutrition* 5. DOI: 10.3389/fnut.2018.00058 [Žiūrėta balandžio 22, 2020].
- Carney L.T., Lane T.W. 2014. Parasites in algae mass culture, *Frontiers in Microbiology* 5. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00278 [Žiūrėta balandžio 1, 2020].
- Cervia L.D., Chang C.-C., Wang L., Mao M., Yuan F. 2018. Enhancing Electrotransfection Efficiency through Improvement in Nuclear Entry of Plasmid DNA, *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 11: 263–271. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.02.009 .
- Chen Y.-S., Liu Y.-H., Teng S.-H., Liao C.-H., Hung C.-C., Sheng W.-H., Teng L.-J., Hsueh P.-R. 2015. Evaluation of the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry Bruker Biotyper for identification of *Penicillium marneffei*, *Paecilomyces* species, *Fusarium solani*, *Rhizopus* species, and *Pseudallescheria boydii*, *Frontiers in Microbiology* 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00679 [Žiūrėta gegužės 14, 2020].

- Chen W.-M., Lin Y.-S., Sheu D.-S., Sheu S.-Y. 2012. *Delftia litopenaei* sp. nov., a poly- -hydroxybutyrate-accumulating bacterium isolated from a freshwater shrimp culture pond, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 62(Pt 10): 2315–2321. DOI: 10.1099/ij.s.0.037507-0 .
- Chen Z., Zheng W., Yang L., Boughner L.A., Tian Y., Zheng T., Xu H. 2017. Lytic and Chemotactic Features of the Plaque-Forming Bacterium KD531 on *Phaeodactylum tricornutum*, *Frontiers in Microbiology* 8. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02581 [Žiūrėta gegužės 18, 2020].
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances* 25(3): 294–306. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001 .
- Cho D.-H., Ramanan R., Heo J., Lee J., Kim B.-H., Oh H.-M., Kim H.-S. 2015. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community, *Bioresource Technology* 175: 578–585. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.159 .
- Choi H.-J., Lee S.-M., Choi H.-J., Lee S.-M. 2013. Performance of *Chlorella vulgaris* for the Removal of Ammonia-Nitrogen from Wastewater, *Environmental Engineering Research* 18(4): 235–239. DOI: 10.4491/eer.2013.18.4.235 .
- Cirri E., Pohnert G. 2019. Algae–bacteria interactions that balance the planktonic microbiome, *New Phytologist* 223(1): 100–106. DOI: 10.1111/nph.15765 .
- Cofrades S., Serdaroğlu M., Jiménez-Colmenero F. 2013. Design of healthier foods and beverages containing whole algae *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Elsevier. DOI: 10.1533/9780857098689.4.609 [Žiūrėta balandžio 23, 2020].
- Cooper M.B., Smith A.G. 2015. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age, *Current Opinion in Plant Biology* 26: 147–153. DOI: 10.1016/j.pbi.2015.07.003 .
- Croft M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E., Warren M.J., Smith A.G. 2005a. Algae acquire vitamin B 12 through a symbiotic relationship with bacteria, *Nature* 438(7064): 90–93. DOI: 10.1038/nature04056 .
- Croft M.T., Lawrence A.D., Raux-Deery E., Warren M.J., Smith A.G. 2005b. Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria, *Nature* 438(7064): 90–93. DOI: 10.1038/nature04056 .
- Daliry S., Hallajani A., Mohammadi Roshandeh J., Nouri H., Golzary A. 2017. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth, *Global Journal of Environmental Science and Management* 3(2). DOI: 10.22034/gjesm.2017.03.02.010 [Žiūrėta kovo 31, 2020].
- Davis R., Aden A., Pienkos P.T. 2011. Techno-economic analysis of autotrophic microalgae for fuel production, *Applied Energy* 88(10): 3524–3531. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.04.018 .
- Deniz I., García-Vaquero M., Imamoglu E. 2017. Trends in red biotechnology *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00018-2 [Žiūrėta balandžio 16, 2020].



- Dewi E.R.S., Nuravivah R. 2018. Potential Of Microalgae *Chlorella vulgaris* As Bioremediation Agents of Heavy Metal Pb (Lead) On Culture Media, *E3S Web of Conferences* 31: 05010. DOI: 10.1051/e3sconf/20183105010 .
- Dhanya B.S., Sowmiya G., Jeslin J., Chamundeeswari M., Verma M.L. 2020. Algal Biotechnology: A Sustainable Route for Omega-3 Fatty Acid Production Md. A. Alam, J.-L. Xu, & Z. Wang, sud. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products.* , Singapore: Springer. DOI: 10.1007/978-981-15-0169-2\_4 [Žiūrėta balandžio 16, 2020].
- Dyo Y.M., Purton S. 2018. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins, *Microbiology* 164: 113–121.
- Dismukes G.C., Carrieri D., Bennette N., Ananyev G.M., Posewitz M.C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels, *Current Opinion in Biotechnology* 19(3): 235–240. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.05.007 .
- Dong T., Knoshaug E.P., Pienkos P.T., Laurens L.M.L. 2016. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review, *Applied Energy* 177: 879–895. DOI: 10.1016/j.apenergy.2016.06.002 .
- Dutz J., Klein Breteler W.C.M., Kramer G. 2005. Inhibition of copepod feeding by exudates and transparent exopolymer particles (TEP) derived from a *Phaeocystis globosa* dominated phytoplankton community, *Harmful Algae* 4(5): 929–940. DOI: 10.1016/j.hal.2004.12.003 .
- Ferreira A., ir kt. 2019. Combining Microalgae-Based Wastewater Treatment with Biofuel and Bio-Based Production in the Frame of a Biorefinery A. Hallmann & P. H. Rampelotto, sud. *Grand Challenges in Algae Biotechnology.* Grand Challenges in Biology and Biotechnology. , Cham: Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-030-25233-5\_9 [Žiūrėta balandžio 14, 2020].
- Fouilland E., Galès A., Beaugelin I., Lanouguère E., Pringault O., Leboulanger C. 2018. Influence of bacteria on the response of microalgae to contaminant mixtures, *Chemosphere* 211: 449–455. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.161 .
- Furbeyre H., Milgen J. van, Mener T., Gloaguen M., Labussière E. 2017. Effects of dietary supplementation with freshwater microalgae on growth performance, nutrient digestibility and gut health in weaned piglets, *animal* 11(2): 183–192. DOI: 10.1017/S1751731116001543 .
- Galasso C., Gentile A., Orefice I., Ianora A., Bruno A., Noonan D.M., Sansone C., Albini A., Brunet C. 2019. Microalgal Derivatives as Potential Nutraceutical and Food Supplements for Human Health: A Focus on Cancer Prevention and Interception, *Nutrients* 11(6). DOI: 10.3390/nu11061226 .
- Garoma T., Janda D. 2016. Investigation of the effects of microalgal cell concentration and electroporation, microwave and ultrasonication on lipid extraction efficiency, *Renewable Energy* 86: 117–123. DOI: 10.1016/j.renene.2015.08.009 .
- Gerken H.G., Donohoe B., Knoshaug E.P. 2012. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production, *Planta* 237(1): 239–253. DOI: 10.1007/s00425-012-1765-0 .

- Glaser R.W., Leikin S.L., Chernomordik L.V., Pastushenko V.F., Sokirko A.I. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 940(2): 275–287. DOI: 10.1016/0005-2736(88)90202-7 .
- Goff L.J., Coleman A.W. 1987. Nuclear Transfer from Parasite to Host, *Annals of the New York Academy of Sciences* 503(1): 402–423. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1987.tb40626.x .
- Goiris K., Muylaert K., De Cooman L. 2015. Microalgae as a Novel Source of Antioxidants for Nutritional Applications *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-800776-1.00017-0 [Žiūrėta balandžio 16, 2020].
- Goli A., Shamiri A., Talaiekhosani A., Eshtiaghi N., Aghamohammadi N., Aroua M.K. 2016. An overview of biological processes and their potential for CO<sub>2</sub> capture, *Journal of Environmental Management* 183: 41–58. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.08.054 .
- Greay T.L., Gofton A.W., Zahedi A., Papparini A., Linge K.L., Joll C.A., Ryan U.M. 2019. Evaluation of 16S next-generation sequencing of hypervariable region 4 in wastewater samples: An unsuitable approach for bacterial enteric pathogen identification, *Science of The Total Environment* 670: 1111–1124. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.03.278 .
- Grosser K., Zedler L., Schmitt M., Dietzek B., Popp J., Pohnert G. 2012. Disruption-free imaging by Raman spectroscopy reveals a chemical sphere with antifouling metabolites around macroalgae, *Biofouling* 28(7): 687–696. DOI: 10.1080/08927014.2012.700306 .
- Gudmundsson S., Agudo L., Nogales J. 2017. 4 - Applications of genome-scale metabolic models of microalgae and cyanobacteria in biotechnology C. Gonzalez-Fernandez & R. Muñoz, sud. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Woodhead Publishing Series in Energy. Woodhead Publishing. DOI: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00004-2 [Žiūrėta balandžio 16, 2020].
- Guihéneuf F., Stengel D.B. 2013a. LC-PUFA-Enriched Oil Production by Microalgae: Accumulation of Lipid and Triacylglycerols Containing n-3 LC-PUFA Is Triggered by Nitrogen Limitation and Inorganic Carbon Availability in the Marine Haptophyte *Pavlova lutheri*, *Marine Drugs* 11(11): 4246–4266. DOI: 10.3390/md11114246 .
- Guihéneuf F., Stengel D.B. 2013b. LC-PUFA-Enriched Oil Production by Microalgae: Accumulation of Lipid and Triacylglycerols Containing n-3 LC-PUFA Is Triggered by Nitrogen Limitation and Inorganic Carbon Availability in the Marine Haptophyte *Pavlova lutheri*, *Marine Drugs* 11(11): 4246–4266. DOI: 10.3390/md11114246 .
- Han P., Lu Q., Fan L., Zhou W. 2019. A Review on the Use of Microalgae for Sustainable Aquaculture, *Applied Sciences* 9(11): 2377. DOI: 10.3390/app9112377 .
- Hancock L., Goff L., Lane C. 2010. Red Algae Lose Key Mitochondrial Genes in Response to Becoming Parasitic, *Genome Biology and Evolution* 2: 897–910. DOI: 10.1093/gbe/evq075 .
- Hempel F., Lau J., Klingl A., Maier U.G. 2011. Algae as Protein Factories: Expression of a Human Antibody and the Respective Antigen in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*, *PLOS ONE* 6(12): e28424. DOI: 10.1371/journal.pone.0028424 .

- Henriques M., Silva A., Rocha J. 2007. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method, *M*: 8.
- Heo J., Kim S., Cho D.-H., Song G.C., Kim H.-S., Ryu C.-M. 2019. Genome-wide exploration of *Escherichia coli* genes to promote *Chlorella vulgaris* growth, *Algal Research* 38: 101390. DOI: 10.1016/j.algal.2018.101390 .
- Hernandez J.-P., de-Bashan L.E., Rodriguez D.J., Rodriguez Y., Bashan Y. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils, *European Journal of Soil Biology* 45(1): 88–93. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2008.08.004 .
- Hernández-Zamora M., Perales-Vela H.V., Flores-Ortíz C.M., Cañizares-Villanueva R.O. 2014. Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to Congo red, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 108: 72–77. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.030 .
- Hess S., Sausen N., Melkonian M. 2012. Shedding Light on Vampires: The Phylogeny of Vampyrellid Amoebae Revisited, *PLOS ONE* 7(2): e31165. DOI: 10.1371/journal.pone.0031165 .
- Hossain S.M.Z. 2019. Biochemical Conversion of Microalgae Biomass into Biofuel, *Chemical Engineering & Technology* 42(12): 2594–2607. DOI: 10.1002/ceat.201800605 .
- Hou Q., ir kt. 2015. Draft Genome Sequence of *Delftia tsuruhatensis* MTQ3, a Strain of Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Antimicrobial Activity, *Genome Announcements* 3(4). DOI: 10.1128/genomeA.00822-15 [Žiūrėta gegužės 14, 2020].
- Huang T. sud. 2016. *Water Pollution and Water Quality Control of Selected Chinese Reservoir Basins*, Cham: Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-319-20391-1 [Žiūrėta birželio 2, 2020].
- Yalcin G., Lee C.-K. 2019. Recent studies on anti-aging compounds with *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism, *Translational Medicine of Aging* 3: 109–115. DOI: 10.1016/j.tma.2019.10.001 .
- Yamamoto M., Fujishita M., Hirata A., Kawano S. 2004. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Journal of Plant Research* 117(4). DOI: 10.1007/s10265-004-0154-6 [Žiūrėta kovo 25, 2020].
- Yamamoto M., Kurihara I., Kawano S. 2005. Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), *Planta* 221(6): 766–775. DOI: 10.1007/s00425-005-1486-8 .
- Yamasaki-Miyamoto Y., Yamasaki M., Tachibana H., Yamada K. 2009. Fucoidan Induces Apoptosis through Activation of Caspase-8 on Human Breast Cancer MCF-7 Cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(18): 8677–8682. DOI: 10.1021/jf9010406 .
- Yan M.-D., Yao C.-J., Chow J.-M., Chang C.-L., Hwang P.-A., Chuang S.-E., Whang-Peng J., Lai G.-M. 2015. Fucoidan Elevates MicroRNA-29b to Regulate DNMT3B-MTSS1 Axis and Inhibit EMT in Human Hepatocellular Carcinoma Cells, *Marine Drugs* 13(10): 6099–6116. DOI: 10.3390/md13106099 .

- Yao S., Lyu S., An Y., Lu J., Gjermansen C., Schramm A. 2019. Microalgae–bacteria symbiosis in microalgal growth and biofuel production: a review, *Journal of Applied Microbiology* 126(2): 359–368. DOI: 10.1111/jam.14095 .
- Yarmush M.L., Golberg A., Serša G., Kotnik T., Miklavčič D. 2014. Electroporation-Based Technologies for Medicine: Principles, Applications, and Challenges, *Annual Review of Biomedical Engineering* 16(1): 295–320. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-071813-104622 .
- Yeh K.-L., Chang J.-S. 2012. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31, *Bioresource Technology* 105: 120–127. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.103 .
- Jackie Reynolds 2011. Counting bacteria, *Richland College*: 9.
- Janda J.M., Abbott S.L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls, *Journal of Clinical Microbiology* 45(9): 2761–2764. DOI: 10.1128/JCM.01228-07 .
- Jarm T., Kramar P. 2015. *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies: Portorož, Slovenia, September 6 –10, 2015* Springer.
- Jin J.-O., Song M.-G., Kim Y.-N., Park J.-I., Kwak J.-Y. 2010. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: Involvement of ERK1/2, JNK, glutathione, and nitric oxide, *Molecular Carcinogenesis* 49(8): 771–782. DOI: 10.1002/mc.20654 .
- Joannes C., Sipaut C.S., Dayou J., Yasir S.M., Mansa R.F. 2015. Review Paper on Cell Membrane Electroporation of Microalgae using Electric Field Treatment Method for Microalgae Lipid Extraction, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 78: 012034. DOI: 10.1088/1757-899X/78/1/012034 .
- Jørgensen N.O.G., Brandt K.K., Nybroe O., Hansen M. 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(Pt 9): 2195–2199. DOI: 10.1099/ijs.0.008375-0 .
- Keener K.M., Hoban T.J. 2000. BIOTECHNOLOGY AND ITS APPLICATIONS.
- Kilian O., Benemann C.S.E., Niyogi K.K., Vick B. 2011. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(52): 21265–21269. DOI: 10.1073/pnas.1105861108 .
- Kim B.-H., Ramanan R., Cho D.-H., Oh H.-M., Kim H.-S. 2014. Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction, *Biomass and Bioenergy* 69: 95–105. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.07.015 .
- Kim J.Y., Kim Y.-G., Lee G.M. 2012. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential, *Applied Microbiology and Biotechnology* 93(3): 917–930. DOI: 10.1007/s00253-011-3758-5 .

- Kinley R.D., Nys R. de, Vucko M.J., Machado L., Tomkins N.W. 2016. The red macroalgae *Asparagopsis taxiformis* is a potent natural antimethanogenic that reduces methane production during in vitro fermentation with rumen fluid, *Animal Production Science* 56(3): 282–289. DOI: 10.1071/AN15576 .
- Koyande A.K., Chew K.W., Rambabu K., Tao Y., Chu D.-T., Show P.-L. 2019. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans, *Food Science and Human Wellness* 8(1): 16–24. DOI: 10.1016/j.fshw.2019.03.001 .
- Kotnik T., Kramar P., Pucihar G., Miklavcic D., Tarek M. 2012. Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon, *IEEE Electrical Insulation Magazine* 28(5): 14–23. DOI: 10.1109/MEI.2012.6268438 .
- Kotnik T., Frey W., Sack M., Haberl Meglič S., Peterka M., Miklavčič D. 2015. Electroporation-based applications in biotechnology, *Trends in Biotechnology* 33(8): 480–488. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.06.002 .
- Kouzuma A., Watanabe K. 2015. Exploring the potential of algae/bacteria interactions, *Current Opinion in Biotechnology* 33: 125–129. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.02.007 .
- Kraft K., Alum A., Abbaszadegan M. 2020. Environmental algal phage isolates and their impact on production potential for food and biofuel applications, *Journal of Applied Microbiology* 128(1): 182–190. DOI: 10.1111/jam.14487 .
- Kreeger D. 1995. Biomass Measurement II. Dry and Ash-Free Dry Weight, : 4.
- Krohn-Molt I., ir kt. 2017. Insights into Microalga and Bacteria Interactions of Selected Phycosphere Biofilms Using Metagenomic, Transcriptomic, and Proteomic Approaches, *Frontiers in Microbiology* 8. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01941 [Žiūrėta gegužės 1, 2020].
- Krug L., Morauf C., Donat C., Müller H., Cernava T., Berg G. 2020. Plant Growth-Promoting Methylobacteria Selectively Increase the Biomass of Biotechnologically Relevant Microalgae, *Frontiers in Microbiology* 11. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00427 [Žiūrėta gegužės 1, 2020].
- Kumar S., Sani R.K. 2017. *Biorefining of Biomass to Biofuels: Opportunities and Perception* Springer.
- Kumar V., Prasad R., Kumar M., Choudhary D.K. 2019. *Microbiome in Plant Health and Disease: Challenges and Opportunities* Springer.
- Lakaniemi A., Intihar V.M., Tuovinen O.H., Puhakka J.A. 2012. Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors, *Microbial biotechnology* 5(1): 69–78. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2011.00298.x .
- Le Chevanton M., Garnier M., Lukomska E., Schreiber N., Cadoret J.-P., Saint-Jean B., Bougaran G. 2016. Effects of Nitrogen Limitation on *Dunaliella* sp.–*Alteromonas* sp. Interactions: From Mutualistic to Competitive Relationships, *Frontiers in Marine Science* 3. DOI: 10.3389/fmars.2016.00123 [Žiūrėta balandžio 3, 2020].
- Le Chevanton M., Garnier M., Bougaran G., Schreiber N., Lukomska E., Bérard J.-B., Fouilland E., Bernard O., Cadoret J.-P. 2013. Screening and selection of growth-

- promoting bacteria for *Dunaliella* cultures, *Algal Research* 2(3): 212–222. DOI: 10.1016/j.algal.2013.05.003 .
- Lebrero R., Toledo-Cervantes A., Muñoz R., Nery V. del, Foresti E. 2016. Biogas upgrading from vinasse digesters: a comparison between an anoxic biotrickling filter and an algal-bacterial photobioreactor, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 91(9): 2488–2495. DOI: 10.1002/jctb.4843 .
- Letcher P.M., Lopez S., Schmieder R., Lee P.A., Behnke C., Powell M.J., McBride R.C. 2013. Characterization of *Amoebophilum protocoecum*, an Algal Parasite New to the Cryptomycota Isolated from an Outdoor Algal Pond Used for the Production of Biofuel, *PLOS ONE* 8(2): e56232. DOI: 10.1371/journal.pone.0056232 .
- Li Y., Chen Y.-F., Chen P., Min M., Zhou W., Martinez B., Zhu J., Ruan R. 2011. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production, *Bioresource Technology* 102(8): 5138–5144. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.01.091 .
- Li Y., Lei X., Zhu H., Zhang H., Guan C., Chen Z., Zheng W., Fu L., Zheng T. 2016. Chitinase producing bacteria with direct algicidal activity on marine diatoms, *Scientific Reports* 6(1): 1–13. DOI: 10.1038/srep21984 .
- Liang Y., Sarkany N., Cui Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions, *Biotechnology Letters* 31(7): 1043–1049. DOI: 10.1007/s10529-009-9975-7 .
- Liu H., Zhou Y., Xiao W., Ji L., Cao X., Song C. 2012. Shifting nutrient-mediated interactions between algae and bacteria in a microcosm: Evidence from alkaline phosphatase assay, *Microbiological Research* 167(5): 292–298. DOI: 10.1016/j.micres.2011.10.005 .
- Liu N., Yang Y., Li F., Ge F., Kuang Y. 2016. Importance of controlling pH-dependent dissolved inorganic carbon to prevent algal bloom outbreaks, *Bioresource Technology* 220: 246–252. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.08.059 .
- Low K.L., Idris A., Mohd Yusof N. 2020. Novel protocol optimized for microalgae lutein used as food additives, *Food Chemistry* 307: 125631. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125631 .
- Luengo E., Condón-Abanto S., Álvarez I., Raso J. 2014. Effect of Pulsed Electric Field Treatments on Permeabilization and Extraction of Pigments from *Chlorella vulgaris*, *The Journal of Membrane Biology* 247(12): 1269–1277. DOI: 10.1007/s00232-014-9688-2 .
- Luengo E., Martínez J.M., Bordetas A., Álvarez I., Raso J. 2015. Influence of the treatment medium temperature on lutein extraction assisted by pulsed electric fields from *Chlorella vulgaris*, *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 29: 15–22. DOI: 10.1016/j.ifset.2015.02.012 .
- Madigan M.T., Buckley D.H., Stahl D.A., Sattley W.M., Bender K.S. 2019. *Brock Biology of Microorganisms* Fifteenth edition, New York: Pearson.
- Mahnič-Kalamiza S., Vorobiev E., Miklavčič D. 2014. Electroporation in Food Processing and Biorefinery, *The Journal of Membrane Biology* 247(12): 1279–1304. DOI: 10.1007/s00232-014-9737-x .

- Manisha S.C.A. 2007. Growth, survival and reproduction in *Chlorella vulgaris* and *C. variegata* with respect to culture age and under different chemical factors, *Folia Microbiologica* 52(4): 399–406. DOI: 10.1007/BF02932095 .
- Marques A.E.M.L., ir kt. 2019. Diets containing residual microalgae biomass protect fishes against oxidative stress and DNA damage, *Journal of Applied Phycology* 31(5): 2933–2940. DOI: 10.1007/s10811-019-01825-6 .
- Matej Mikulic 2018. Biotechnology industry - Statistics & Facts, *www.statista.com* Prieiga per internetą: <https://www.statista.com/topics/1634/biotechnology-industry/>.
- McKendry P. 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass, *Bioresource Technology* 83(1): 37–46. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00118-3 .
- Meyer N., Bigalke A., Kaulfuß A., Pohnert G. 2017. Strategies and ecological roles of algicidal bacteria, *FEMS Microbiology Reviews* 41(6): 880–899. DOI: 10.1093/femsre/fux029 .
- Mindl B., Sonntag B., Pernthaler J., Vrba J., Psenner R., Posch T. 2005. Effects of phosphorus loading on interactions of algae and bacteria: reinvestigation of the ‘phytoplankton–bacteria paradox’ in a continuous cultivation system, *Aquatic Microbial Ecology* 38(3): 203–213. DOI: 10.3354/ame038203 .
- Mohammad Mirzaie M.A., Kalbasi M., Mousavi S.M., Ghobadian B. 2015. Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium, *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46(2): 150–156. DOI: 10.1080/10826068.2014.995812 .
- Moran C.A., Morlacchini M., Keegan J.D., Fusconi G. 2018. The effect of dietary supplementation with *Aurantiochytrium limacinum* on lactating dairy cows in terms of animal health, productivity and milk composition, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 102(2): 576–590. DOI: 10.1111/jpn.12827 .
- Mourelle M.L., Gómez C.P., Legido J.L. 2017. The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy, *Cosmetics* 4(4): 46. DOI: 10.3390/cosmetics4040046 .
- Muñoz C.F., ir kt. 2018. Improved DNA/protein delivery in microalgae – A simple and reliable method for the prediction of optimal electroporation settings, *Algal Research* 33: 448–455. DOI: 10.1016/j.algal.2018.06.021 .
- Muntyan M.S., Morozov D.A., Klishin S.S., Khitrin N.V., Kolomijtseva G.Ya. 2012. Evaluation of the electrical potential on the membrane of the extremely alkaliphilic bacterium *Thioalkalivibrio*, *Biochemistry (Moscow)* 77(8): 917–924. DOI: 10.1134/S0006297912080135 .
- Narala R.R., Garg S., Sharma K.K., Thomas-Hall S.R., Deme M., Li Y., Schenk P.M. 2016. Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System, *Frontiers in Energy Research* 4. DOI: 10.3389/fenrg.2016.00029 [Žiūrėta kovo 30, 2020].
- Nashid N., Yau Y. 2016. Evaluation of the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Identification of Cystic Fibrosis Pathogens, *Open Forum Infectious Diseases* 3(suppl\_1). DOI: 10.1093/ofid/ofw172.44 [Žiūrėta birželio 2, 2020].

- Nehmé R., ir kt. 2016. Microalgae amino acid extraction and analysis at nanomolar level using electroporation and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Journal of Separation Science* 40(2): 558–566. DOI: 10.1002/jssc.201601005 .
- Nelson V.C., Starcher K.L. 2015. *Introduction to Renewable Energy* CRC Press.
- Neuhauser C., Fargione J.E. 2004. A mutualism–parasitism continuum model and its application to plant–mycorrhizae interactions, *Ecological Modelling* 177(3): 337–352. DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2004.02.010 .
- Nickoloff J.A. 1995. *Electroporation Protocols for Microorganisms* Springer Science & Business Media.
- Ogawa K., Arai M., Naganawa H., Ikeda Y., Kondo S. 2001. A New  $\beta$ -D-Galactan Having 3-o-Methyl-D-galactose from *Chlorella vulgaris*, *Journal of Applied Glycoscience* 48(4): 325–330. DOI: 10.5458/jag.48.325 .
- Ogawa K., Ikeda Y., Kondo S. 1999. A new trisaccharide,  $\alpha$ -d-glucopyranuronosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -l-rhamnopyranose from *Chlorella vulgaris*, *Carbohydrate Research* 321(1): 128–131. DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00176-7 .
- Oyebamiji O.O., Boeing W.J., Holguin F.O., Ilori O., Amund O. 2019. Green microalgae cultured in textile wastewater for biomass generation and biodegradation of heavy metals and chromogenic substances, *Bioresource Technology Reports* 7: 100247. DOI: 10.1016/j.biteb.2019.100247 .
- Ópez I., Ercado M., Éllez F.T., Urado J., Nducho A. 2017. VARIATION OF THE BACTERIAL COMMUNITIES IN THE RHIZOSPHERE OF THREE SPECIES OF THE GENUS TAGETES ( MARIGOLD ) OVER TIME.
- Pakhomov A.G., Gianulis E., Vernier P.T., Semenov I., Xiao S., Pakhomova O.N. 2015. Multiple nanosecond electric pulses increase the number but not the size of long-lived nanopores in the cell membrane, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848(4): 958–966. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.12.026 .
- Papachristou I., Silve A., Jianu A., Wüstner R., Nazarova N., Müller G., Frey W. 2020. Evaluation of pulsed electric fields effect on the microalgae cell mechanical stability through high pressure homogenization, *Algal Research* 47: 101847. DOI: 10.1016/j.algal.2020.101847 .
- Parks D.H., Chuvochina M., Waite D.W., Rinke C., Skarshewski A., Chaumeil P.-A., Hugenholtz P. 2018. A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life, *Nature Biotechnology* 36(10): 996–1004. DOI: 10.1038/nbt.4229 .
- Pascual C., Akmirza I., Pérez R., Arnaiz E., Muñoz R., Lebrero R. 2020. Trimethylamine abatement in algal-bacterial photobioreactors, *Environmental Science and Pollution Research* 27(9): 9028–9037. DOI: 10.1007/s11356-019-07369-z .
- Patel J.B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory, *Molecular Diagnosis* 6(4): 313–321. DOI: 10.1054/modi.2001.29158 .



- Phukan M.M., Chutia R.S., Konwar B.K., Kataki R. 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock, *Applied Energy* 88(10): 3307–3312. DOI: 10.1016/j.apenergy.2010.11.026 .
- Pieper S., Unterrieser I., Mann F., Mischnick P. 2012. A new arabinomannan from the cell wall of the chlorococcal algae *Chlorella vulgaris*, *Carbohydrate Research* 352: 166–176. DOI: 10.1016/j.carres.2012.02.007 .
- Pina-Pérez M.C., Rivas A., Martínez A., Rodrigo D. 2017. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food, *Food Chemistry* 235: 34–44. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.05.033 .
- Posadas E., ir kt. 2017. 3 - Microalgae cultivation in wastewater C. Gonzalez-Fernandez & Raúl Muñoz, sud. *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts*. Woodhead Publishing Series in Energy. Woodhead Publishing. DOI: 10.1016/B978-0-08-101023-5.00003-0 [Žiūrėta balandžio 14, 2020].
- Priyadarshani I., Rath B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae – A review., *J. Algal Biomass Utiln.* Prieiga per internetą: [https://www.researchgate.net/publication/274024645\\_Commercial\\_and\\_industrial\\_applications\\_of\\_micro\\_algae\\_-\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/274024645_Commercial_and_industrial_applications_of_micro_algae_-_A_review).
- Qi X., Ren Y., Liang P., Wang X. 2018. New insights in photosynthetic microbial fuel cell using anoxygenic phototrophic bacteria, *Bioresource Technology* 258: 310–317. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.03.058 .
- Raheem A., Prinsen P., Vuppaladadiyam A.K., Ming Z., Luque R. 2018. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: recent developments., *Journal of Cleaner Production* 181: 42–59.
- Ramanan R., Kim B.-H., Cho D.-H., Oh H.-M., Kim H.-S. 2016. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications, *Biotechnology Advances* 34(1): 14–29. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2015.12.003 .
- Ramasamy D., Mishra A.K., Lagier J.-C., Padhmanabhan R., Rossi M., Sentausa E., Raoult D., Fournier P.-E. 2014. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species, *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 64(Pt 2): 384–391. DOI: 10.1099/ijs.0.057091-0 .
- Ranc A., Dubourg G., Fournier P.E., Raoult D., Fenollar F. 2018. *Delftia tsuruhatensis*, an Emergent Opportunistic Healthcare-Associated Pathogen, *Emerging Infectious Diseases* 24(3): 594–596. DOI: 10.3201/eid2403.160939 .
- Raposo M.F. de J., de Morais A.M.M.B., de Morais R.M.S.C. 2014. Influence of sulphate on the composition and antibacterial and antiviral properties of the exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum*, *Life Sciences* 101(1): 56–63. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.02.013 .
- Ravishankar G.A., Rao A.R. 2019. *Handbook of Algal Technologies and Phytochemicals: Two Volume Set* CRC Press.

- Renuka N., Sood A., Ratha S.K., Prasanna R., Ahluwalia A.S. 2013. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production, *Journal of Applied Phycology* 25(5): 1529–1537. DOI: 10.1007/s10811-013-9982-x .
- Richmond A., Hu Q. 2013. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2nd Edition* | WileyPrieiga per internetą: <https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Microalgal+Culture%3A+Applied+Phycology+and+Biotechnology+%2C+2nd+Edition-p-9780470673898>.
- Rivas M.O., Vargas P., Riquelme C.E. 2010. Interactions of *Botryococcus braunii* Cultures with Bacterial Biofilms, *Microbial Ecology* 60(3): 628–635. DOI: 10.1007/s00248-010-9686-6 .
- Rockenbach A., ir kt. 2019. Microfluidic Irreversible Electroporation—A Versatile Tool to Extract Intracellular Contents of Bacteria and Yeast, *Metabolites* 9(10): 211. DOI: 10.3390/metabo9100211 .
- Rosazza C., Meglic S.H., Zumbusch A., Miklavcic M.-P.R. and D. 2016. Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective, *Current Gene Therapy* 16(2): 98–129Prieiga per internetą: <http://www.eurekaselect.com/140801/article>.
- Rosenbaum M., He Z., Angenent L.T. 2010. Light energy to bioelectricity: photosynthetic microbial fuel cells, *Current Opinion in Biotechnology* 21(3): 259–264. DOI: 10.1016/j.copbio.2010.03.010 .
- Roth P.B., Twiner M.J., Mikulski C.M., Barnhorst A.B., Doucette G.J. 2008. Comparative analysis of two algicidal bacteria active against the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*, *Harmful Algae* 7(5): 682–691. DOI: 10.1016/j.hal.2008.02.002 .
- Ru I.T.K., Sung Y.Y., Jusoh M., Wahid M.E.A., Nagappan T. 2020. *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts, *Applied Phycology* 1(1): 2–11. DOI: 10.1080/26388081.2020.1715256 .
- Sachs J.L., Wilcox T.P. 2005. A shift to parasitism in the jellyfish symbiont *Symbiodinium microadriaticum*, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273(1585): 425–429. DOI: 10.1098/rspb.2005.3346 .
- Sadeghizadeh A., Farhad dad F., Moghaddasi L., Rahimi R. 2017. CO<sub>2</sub> capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor, *Bioresource Technology* 243: 441–447. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.06.147 .
- Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.-Y., Vaca-Garcia C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35: 265–278. DOI: 10.1016/j.rser.2014.04.007 .
- Sayre R. 2010. Microalgae: The Potential for Carbon Capture, *BioScience* 60(9): 722–727. DOI: 10.1525/bio.2010.60.9.9 .
- Sakarika M., Kornaros M. 2019. *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production, *Bioresource Technology* 273: 237–243. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.11.017 .
- Samie A. 2017. *Escherichia coli: Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*BoD – Books on Demand.

- Sandle T. 2016. Microbial identification T. Sandle, sud. *Pharmaceutical Microbiology*. , Oxford: Woodhead Publishing. DOI: 10.1016/B978-0-08-100022-9.00009-8 [Žiūrėta gegužės 17, 2020].
- Satpati G.G., Pal R. 2018. Microalgae- Biomass to Biodiesel: A Review, : 28.
- Scheffer H.J., ir kt. 2014. Irreversible Electroporation for Nonthermal Tumor Ablation in the Clinical Setting: A Systematic Review of Safety and Efficacy, *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 25(7): 997–1011. DOI: 10.1016/j.jvir.2014.01.028 .
- Scherer D., Krust D., Frey W., Mueller G., Nick P., Gusbeth C. 2019. Pulsed electric field (PEF)-assisted protein recovery from *Chlorella vulgaris* is mediated by an enzymatic process after cell death, *Algal Research* 41: 101536. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101536 .
- Ścieszka S., Klewicka E. 2019. Algae in food: a general review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(21): 3538–3547. DOI: 10.1080/10408398.2018.1496319 .
- Segev E., ir kt. 2016. Dynamic metabolic exchange governs a marine algal-bacterial interaction P. G. Falkowski, sud., *eLife* 5: e17473. DOI: 10.7554/eLife.17473 .
- Seymour J.R., Amin S.A., Raina J.-B., Stocker R. 2017. Zooming in on the phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships, *Nature Microbiology* 2(7): 1–12. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.65 .
- Senhorinho G.N.A., Ross G.M., Scott J.A. 2015. Cyanobacteria and eukaryotic microalgae as potential sources of antibiotics, *Phycologia* 54(3): 271–282. DOI: 10.2216/14-092.1 .
- Shigematsu T., Yumihara K., Ueda Y., Numaguchi M., Morimura S., Kida K. 2003. *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(Pt 5): 1479–1483. DOI: 10.1099/ij.s.0.02285-0 .
- Simonis P., Kersulis S., Stankevich V., Sinkevic K., Striguniene K., Ragoza G., Stirke A. 2019. Pulsed electric field effects on inactivation of microorganisms in acid whey, *International Journal of Food Microbiology* 291: 128–134. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.024 .
- Smetana S., Sandmann M., Rohn S., Pleissner D., Heinz V. 2017. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment, *Bioresource Technology* 245(Pt A): 162–170. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.08.113 .
- Smriga S., Fernandez V.I., Mitchell J.G., Stocker R. 2016. Chemotaxis toward phytoplankton drives organic matter partitioning among marine bacteria, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(6): 1576–1581. DOI: 10.1073/pnas.1512307113 .
- Soto-Sierra L., Stoykova P., Nikolov Z.L. 2018. Extraction and fractionation of microalgae-based protein products, *Algal Research* 36: 175–192. DOI: 10.1016/j.algal.2018.10.023 .
- Stankevich V., Simonis P., Zurauskiene N., Stirke A., Dervinis A., Bleizgys V., Kersulis S., Balevicius S. 2020. Compact Square-Wave Pulse Electroporator with Controlled

- Electroporation Efficiency and Cell Viability, *Symmetry* 12(3): 412. DOI: 10.3390/sym12030412 .
- Sucu E. 2020. Effects of Microalgae Species on In Vitro Rumen Fermentation Pattern and Methane Production, *Annals of Animal Science* 20(1): 207–218. DOI: 10.2478/aoas-2019-0061 .
- Sun R., Sun P., Zhang J., Esquivel-Elizondo S., Wu Y. 2018. Microorganisms-based methods for harmful algal blooms control: A review, *Bioresource Technology* 248: 12–20. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.175 .
- Suthar S., Verma R. 2018. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock, *Process Safety and Environmental Protection* 113: 141–148. DOI: 10.1016/j.psep.2017.09.018 .
- Suttle C.A. 2007. Marine viruses — major players in the global ecosystem, *Nature Reviews Microbiology* 5(10): 801–812. DOI: 10.1038/nrmicro1750 .
- Takeda H. 1991. Sugar composition of the cell wall and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae), *Journal of Phycology* 27(2): 224–232. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1991.00224.x .
- Tan K., Huang Z., Ji R., Qiu Y., Wang Z., Liu J. 2019. A review of allelopathy on microalgae, *Microbiology*, 165(6): 587–592. DOI: 10.1099/mic.0.000776 .
- Teplitski M., Rajamani S. 2011. Signal and Nutrient Exchange in the Interactions Between Soil Algae and Bacteria G. Witzany, sud. *Biocommunication in Soil Microorganisms*. Soil Biology. , Berlin, Heidelberg: Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-14512-4\_16 [Žiūrėta balandžio 1, 2020].
- Thimijan R.W. 1983. Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure A Review of Procedures for Interconversion, 18: 5.
- Tian J., ir kt. 2017. A self-powered sterilization system with both instant and sustainable antibacterial ability, *Nano Energy* 36: 241–249. DOI: 10.1016/j.nanoen.2017.04.030 .
- Toyama T., Kasuya M., Hanaoka T., Kobayashi N., Tanaka Y., Inoue D., Sei K., Morikawa M., Mori K. 2018. Growth promotion of three microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* and *Euglena gracilis*, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent, *Biotechnology for Biofuels* 11(1): 176. DOI: 10.1186/s13068-018-1174-0 .
- Tsukahara K., Sawayama S. 2005. Liquid Fuel Production Using Microalgae, *Journal of the Japan Petroleum Institute* 48(5): 251–259. DOI: 10.1627/jpi.48.251 .
- Ubalde M.C., Braña V., Sueiro F., Morel M.A., Martínez-Rosales C., Marquez C., Castro-Sowinski S. 2012. The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies, *Current Microbiology* 64(6): 597–603. DOI: 10.1007/s00284-012-0108-5 .
- United Nations Department of Economic and Social Affairs 2017. World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100, *UN DESA | United Nations Department of Economic and Social Affairs* Prieiga per internetą: <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html>.

- Vadiveloo A., Moheimani N.R., Alghamedi R., Cosgrove J.J., Alameh K., Parlevliet D. 2016. Sustainable cultivation of microalgae by an insulated glazed glass plate photobioreactor, *Biotechnology Journal* 11(3): 363–374. DOI: 10.1002/biot.201500358 .
- Vásquez-Piñeros M.A., Martínez-Lavanchy P.M., Jehmlich N., Pieper D.H., Rincón C.A., Harms H., Junca H., Heipieper H.J. 2018. Delftia sp. LCW, a strain isolated from a constructed wetland shows novel properties for dimethylphenol isomers degradation, *BMC Microbiology* 18(1): 108. DOI: 10.1186/s12866-018-1255-z .
- Velichko N.V., Pinevich A.V. 2019. Classification and Identification Tasks in Microbiology: Mass Spectrometric Methods Coming to the Aid, *Microbiology* 88(5): 534–547. DOI: 10.1134/S0026261719050151 .
- de Vree J.H., Bosma R., Janssen M., Barbosa M.J., Wijffels R.H. 2015. Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors, *Biotechnology for Biofuels* 8. DOI: 10.1186/s13068-015-0400-2 [Žiūrėta kovo 30, 2020].
- Wang Y., Xing M., Cao Q., Ji A., Liang H., Song S. 2019. Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies, *Marine Drugs* 17(3). DOI: 10.3390/md17030183 .
- Wang Y., Stessman D.J., Spalding M.H. 2015. The CO<sub>2</sub> concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO<sub>2</sub>: how Chlamydomonas works against the gradient, *The Plant Journal* 82(3): 429–448. DOI: 10.1111/tpj.12829 .
- Wang T., Chen H., Yu C., Xie X. 2019. Rapid determination of the electroporation threshold for bacteria inactivation using a lab-on-a-chip platform, *Environment International* 132: 105040. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105040 .
- Wang X., Li Z., Su J., Tian Y., Ning X., Hong H., Zheng T. 2010. Lysis of a red-tide causing alga, *Alexandrium tamarense*, caused by bacteria from its phycosphere, *Biological Control* 52(2): 123–130. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.10.004 .
- Wang X., Xu X. 2012. Molecular cloning and functional analyses of glutathione peroxidase homologous genes from *Chlorella* sp. NJ-18, *Gene* 501(1): 17–23. DOI: 10.1016/j.gene.2012.04.003 .
- Weaver J.C., Chizmadzhev Yu.A. 1996. Theory of electroporation: A review, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 41(2): 135–160. DOI: 10.1016/S0302-4598(96)05062-3 .
- Weyer K.M., Bush D.R., Darzins A., Willson B.D. 2010. Theoretical Maximum Algal Oil Production, *BioEnergy Research* 3(2): 204–213. DOI: 10.1007/s12155-009-9046-x .
- Wong Y. 2017. Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production, *Journal of Aquaculture & Marine Biology* 6(1). DOI: 10.15406/jamb.2017.06.00143 [Žiūrėta birželio 3, 2020].
- Zgheib N., Saade R., Khallouf R., Takache H. 2018. Extraction of astaxanthin from microalgae: process design and economic feasibility study, *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 323: 012011. DOI: 10.1088/1757-899X/323/1/012011 .
- Zhang H., Tang Y., Zhang Y., Zhang S., Qu J., Wang X., Kong R., Han C., Liu Z. 2015. Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient, *Evidence-based*

*Complementary and Alternative Medicine : eCAM* 2015. DOI: 10.1155/2015/723515 [Žiūrėta balandžio 17, 2020].

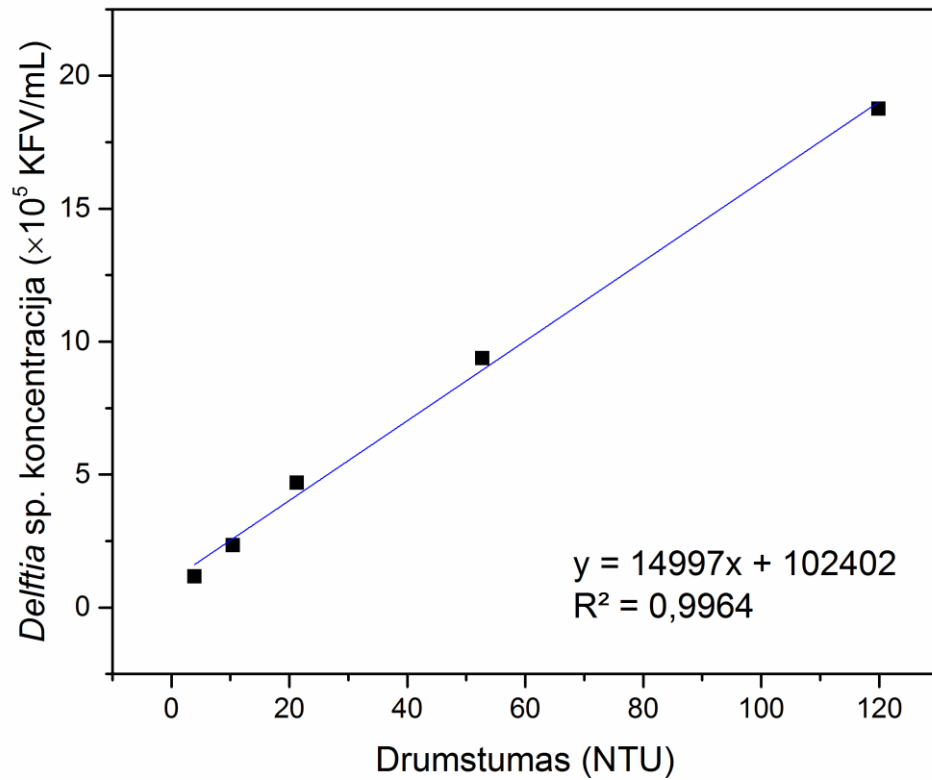
Zhang J., Liu L., Chen F. 2019. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity, *International Journal of Biological Macromolecules* 134: 976–983. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.117 .

Zhou J., Lyu Y., Richlen M., Anderson D.M., Cai Z. 2016. Quorum sensing is a language of chemical signals and plays an ecological role in algal-bacterial interactions, *Critical reviews in plant sciences* 35(2): 81–105. DOI: 10.1080/07352689.2016.1172461 .

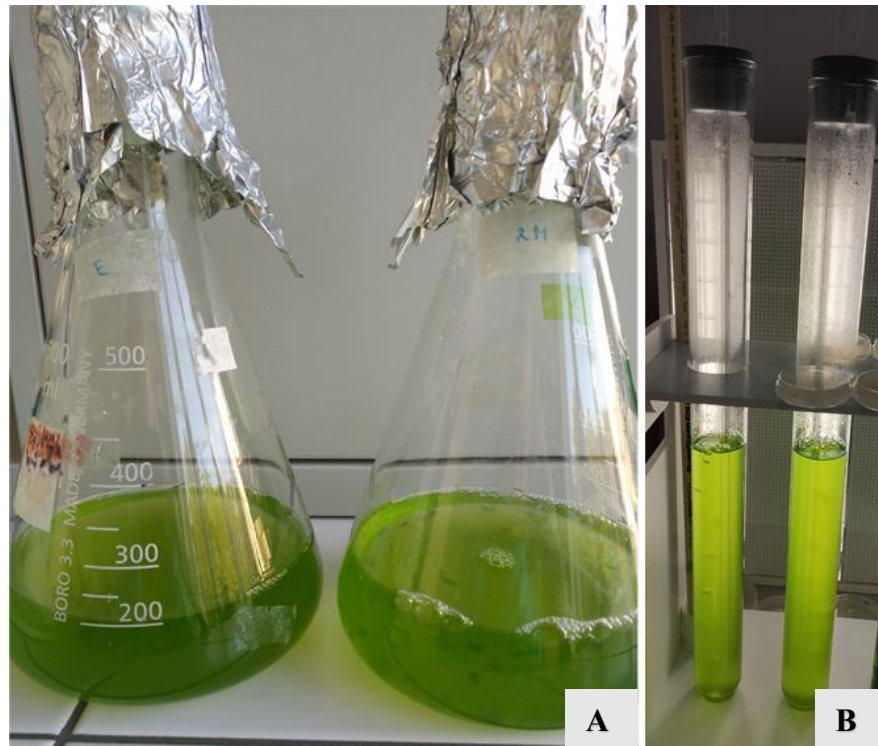
Zhu C., Zhai X., Xi Y., Wang J., Kong F., Zhao Y., Chi Z. 2019. Progress on the development of floating photobioreactor for microalgae cultivation and its application potential, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 35(12): 190. DOI: 10.1007/s11274-019-2767-x .

Zuccarello G.C., Moon D., Goff L.J. 2004. A Phylogenetic Study of Parasitic Genera Placed in the Family Choreocolacaceae (rhodophyta)1, *Journal of Phycology* 40(5): 937–945. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2004.04029.x .

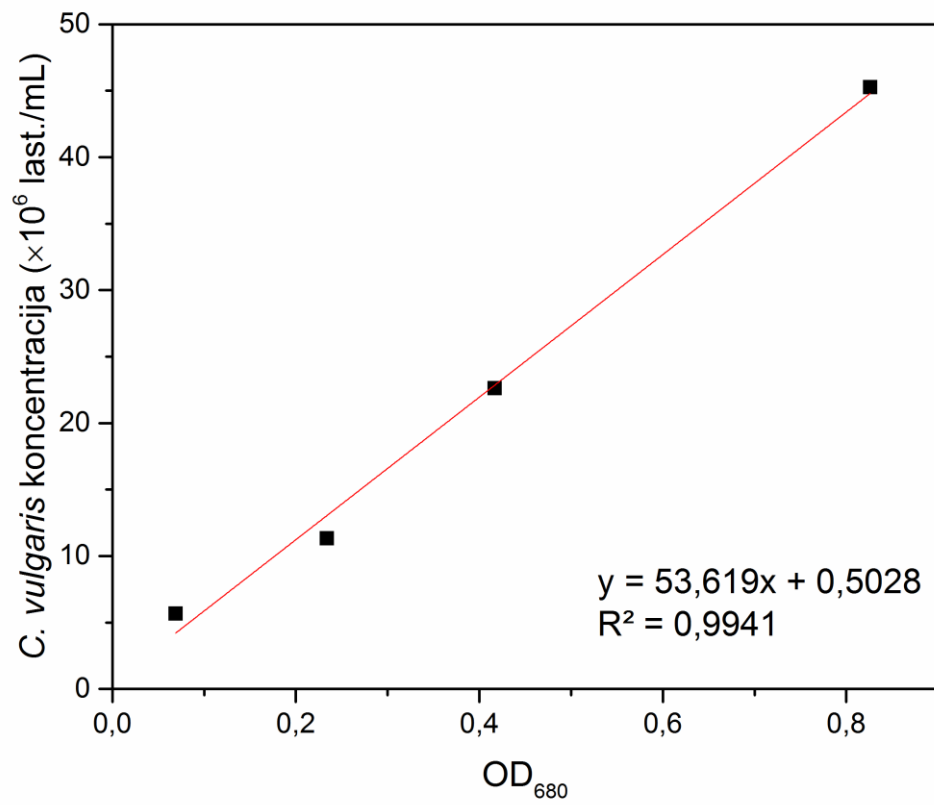
## PRIEDAI



1 priedas. *Delftia* sp. bakterijų kolonijas formuojančių vienetų (KfV) – drumstumo kalibracinė kreivė

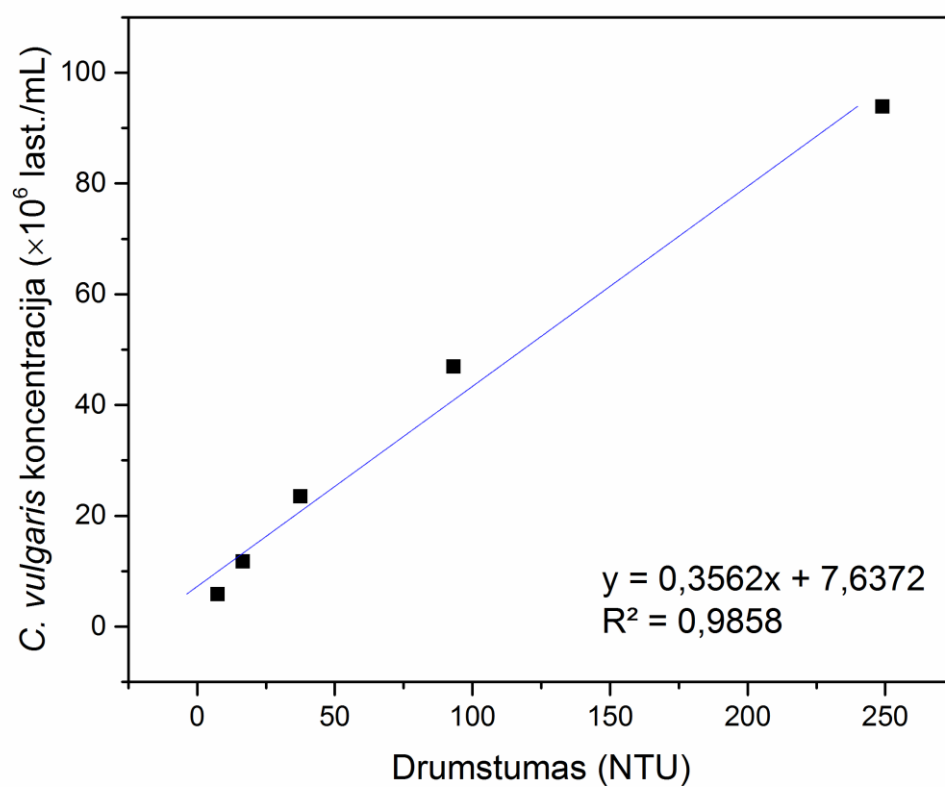


2 priedas. *C. vulgaris* ir *Delftia* sp. kultivavimo etapai. A – pirmasis kultivavimo etapas Erlenmejerio kolbose. B – antrasis kultivavimo etapas fotobioreaktoriuose.



3 priedas. *C. vulgaris* mikrodumblių ląstelių koncentracijos – optinio tankio kalibracinė kreivė





4 priedas. *C. vulgaris* mikrodumblių ląstelių koncentracijos – drumstumo kalibracinė kreivė



5 priedas. Sauso dumblių biomasės nustatymas. Filtras prieš ir po filtracijos.