

短期连续剪切对光生物反应器内海带配子体细胞生长及其恢复能力的影响

Effects of Short-term Continuous Shear Stress on Cells Growth and Recovery of *Laminaria japonica* Gametophytic Cells in Photobioreactor

黄 娜, 陈思晔, 齐瀚实*

HUANG Na, CHEN Si-Ye and QI Han-Shi*

上海交通大学细胞工程中心, 上海 200240

Center of Cell Culture and Bioprocess Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

摘 要 以不同搅拌速率(0~1000r/min)对海带(*Laminaria japonica*)配子体细胞施加短期(0~60h)连续剪切,卸载剪切力之后细胞静止恢复 23.5d,在此期间研究不同搅拌速率分别在连续剪切和恢复期间对细胞生长及其恢复能力的影响。研究结果表明,连续剪切期间,90r/min 下细胞叶绿素浓度积累达到最大值 2.36mg/L;中高速搅拌速率(270~1000r/min)下叶绿素浓度迅速下降,胞内氮磷池释放,1000r/min 下细胞损伤率为静止对照样的 18 倍。恢复期间,所有组别细胞均呈现较强的恢复能力。此外,在连续剪切实验中,海带配子体细胞内叶绿素浓度比干重更能有效的表达生物量浓度,除细胞损伤率外,磷源释放可以作为判别细胞受损的参考指标之一。

关键词 搅拌速率,光生物反应器,连续剪切,恢复能力,配子体细胞,氮,磷

中图分类号 Q813.1 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0935-06

Abstract *Laminaria japonica* gametophytic cells were cultivated in a photobioreactor under continuous shear stress(0~1000r/min) in 60 hours and the following static cultivation within 23.5 days. The content of chlorophyll a reached the maximum value of 2.36mg/L at the end of continuous shear stress when the agitation speed was 90r/min, while the chlorophyll a(chl a) concentration decreased quickly and nitrogen and phosphorus were released under high shear force(270~1000r/min). The cell injury ratio at 1000r/min was as 18 times as that of the control. During the recovery course, gametophytic cells showed themselves distinct recovery capability at all agitation speeds. Furthermore, the content of chl a is a more exact index as biomass than dry cells weight(DCW). Besides cell injury ratio, the liberation of phosphorus demonstrates the cells injury.

Key words agitation speed, photobioreactor, continuous shear stress, recovery, gametophytic cell, nitrogen, phosphorus

大型海藻是琼脂、卡拉胶、褐藻胶等化工产品的
主要来源^[1],对于海洋药物的发展也具有重要意义,
其体内的类廿烷烯(eicosanoids)类物质、次生代谢产

物卤代萜类具有典型的生理调节、抗菌、抗肿瘤的活
性^{[2][3]}。1995 年 Qi 等首次开始研究光生物反应器
培养大型海藻细胞^[4],随后,关于光照强度、光照周

Received: December 25, 2006; Accepted: February 1, 2007.

This work was supported by a grant from the National High Technology and Development of China(No.2002AA629070).

* Corresponding author. Tel: +86-21-34204745; Fax: +86-21-34204746; E-mail: biotech@sjtu.edu.cn

国家高技术研究与发展计划资助(No. 2002AA629070)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

期、温度、营养元素和气体供给等与光生物反应器中大型海藻细胞和组织生长的关系都已相继报道^[4-7]。在细胞悬浮培养过程中,通常依靠机械搅拌将气泡打碎,加强液体湍动,增加传质速率,调节培养液 pH 值,有效提高藻类生长速度和生长密度^[8],但搅拌同时会产生剪切力,大多数研究表明,剪切力会造成细胞损伤,影响细胞形态、聚集状态、代谢及细胞存活率等^[9-11]。因此,剪切力是影响光生物反应器悬浮培养的重要参数之一。大型海藻细胞对剪切较为敏感,但敏感程度取决于大型海藻种类。糖昆布(*Laminaria saccharina*)雌性配子体细胞抗剪切力很强,用匀质器在 7000r/min 下搅拌 20~30s,仍能存活,并迅速生长^[2]。但本实验室前期研究表明,海带配子体细胞培养过程中,剪切力过大会造成生物量的降低和叶绿素的外泄(实验数据未发表)。因此,对于特定的细胞培养,摸索其可以耐受的临界剪切力显得尤为重要,国内外尚未出现具体的关于大型海藻细胞或组织光生物反应器悬浮培养过程中的连续剪切力的研究。本文首次详尽地描述了不同搅拌速率下,短期连续剪切对光生物反应器培养大型海藻配子体细胞生物量、氮、磷营养物质吸收、细胞受损率和细胞形态等方面的影响,以及卸载剪切力后,细胞的恢复能力。

1 材料与方法

1.1 藻种、培养基及保藏方式

海带(*Laminaria japonica*)雌性配子体克隆系,由中科院海洋所提供。

使用 APSW 人工海水为基础培养基^[12],并添加维生素(VB₁-HCl, VB₁₂, Biotin),限制性营养元素(KNO₃, KH₂PO₄),它们的最终浓度分别为(mg/L): 0.25、0.000125、0.000125、60、5,培养基用 0.22 μ m 滤膜抽滤。

藻种保存于光照培养箱中,温度为 10 \pm 1 $^{\circ}$ C,光照强度和光暗周期分别为 20 μ E/m \cdot s 和 16h 8h。

剪切实验前,将细胞连同培养基用打碎机在 3000r/min 下搅拌 2s,再静止培养恢复一个月后开始实验。

1.2 实验装置与处理

搅拌式光生物反应器系统由培养罐、恒温系统、照明系统、搅拌系统等部分组成。整个培养系统在全无菌环境中运行。圆柱形培养罐工作体积 500mL,高径比为 5:4。培养温度为 13 \pm 1 $^{\circ}$ C,光照强度为 40 μ E/(m \cdot s),光暗周期为 16h:8h。搅拌系统由搅拌

器和置于瓶底的两端光滑圆柱搅拌子(长 3.5cm, Φ 0.9cm)组成,按转速(r/min)不同分为八组:(对照) 90、120、150、180、270、600、1000,转子叶端线速度(m/s)分别为:0.165、0.220、0.275、0.330、0.495、1.099、1.832,每组有三个平行样。初始接种密度均为 200mg DCW/L。接种之后,所有组均静止培养,待细胞生长进入对数生长期后(8d),再将搅拌速率调至之前设定的各自速度,连续剪切 2.5d,期间每 0.5 天取样 1 次;之后将各搅拌速度调至零,藻体静止恢复 23.5d,期间每 5 天取样 1 次。

1.3 实验参数的测定

1.3.1 细胞干重测定 均匀取一定体积藻样,4000 r/min 离心 5min,去离子水洗涤后,70 $^{\circ}$ C 烘干 24h,称其干重。培养前通过测定接种瓶中藻体干重密度(DCW/L)确定接种量,并在连续剪切结束时再次测定藻体干重密度。

1.3.2 叶绿素浓度的测定 采取测定叶绿素 a(chl a)浓度的方法来表征细胞量。均匀取一定体积藻样,4000r/min 离心 5min,去离子水洗涤并收集,用 90% 冰丙酮 4 $^{\circ}$ C 下抽提 24h,分别在 664、647、630nm 下记录抽提液光吸收值,根据公式 Jeffrey 方程计算 chl a 的浓度^[13]。

1.3.3 氮、磷浓度的测定 采用 Collos 方法测定培养液中硝酸根离子浓度^[14]。运用 Origin Pro 软件绘制 NO₃⁻ 浓度标准曲线并得出线性方程,均匀取样离心后,取上清液适当稀释,测定 220nm 处的 OD 值代入线性方程计算得 NO₃⁻ 浓度。

采用抗坏血酸-酒石酸锑钾-钼酸铵方法测定磷酸根离子浓度^[15]。运用 Origin Pro 软件绘制 PO₄³⁻ 浓度标准曲线并得出线性方程,均匀取样离心后,取上清液适当稀释,显色反应 15min,测定 885nm 处的 OD 值代入线性方程计算得 PO₄³⁻ 浓度。

1.3.4 细胞损伤率的测定 采用 Trypan Blue 染色法测定细胞损伤率^[16]。配子体细胞受剪切力损伤后,细胞膜通透性发生变化,染色剂可以进入细胞内将其染成蓝色。均匀取出一定体积藻样,和相同体积 0.04% Trypan blue 染料反应 20min(不得超过 30min),显微镜(CX41 奥林巴斯)下统计被染色细胞(即损伤细胞)和总细胞数,计算存活率。所有试验数据均为三次测定的平均值。

2 结果与讨论

2.1 连续剪切期间不同搅拌速率对叶绿素浓度的影响

在相同的温度和光照条件下,海带配子体细胞

中 chl a 的含量基本稳定,因此 chl a 的浓度可以有效地表征相应组中细胞浓度的变化^[7]。不同搅拌速率对配子体细胞施加连续剪切 2.5d,图 1 为不同搅拌速率下细胞 chl a 浓度曲线。

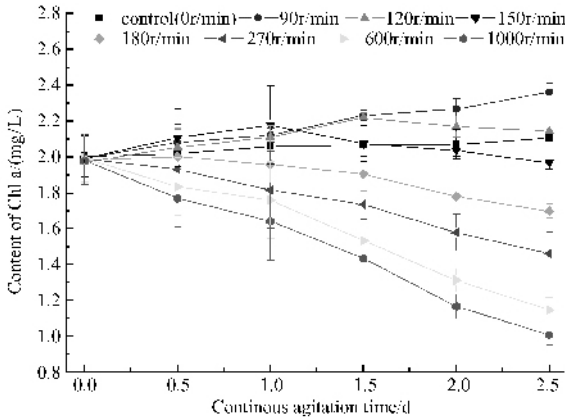


图 1 连续剪切期间不同搅拌速率对细胞叶绿素浓度的影响

Fig. 1 Effect of agitation speed on content of cellular chlorophyll a in continuous shear course

从图 1 可以看出,不同搅拌速率所产生的剪切力对细胞叶绿素浓度的影响存在很大差别。在一定搅拌速率,一定搅拌时间内(90r/min 连续搅拌 2.5d,120r/min 连续搅拌 1.5d,150r/min 连续搅拌 1d),细胞叶绿素浓度增长率大约是静止对照样的 2~4 倍,90r/min 下细胞叶绿素浓度积累达到最大值 2.36 mg/L,但搅拌速率过大(180~1000r/min)或搅拌时间过长(120r/min 连续搅拌 1.5d 之后,150r/min 连续搅拌 1d 之后)叶绿素浓度会呈现负增长,且负增长率随搅拌速率的增加而增大。分析其原因,适当的剪切力有利于形成体系的悬浮状态,促进细胞均匀吸收光强、营养物质和气体,从而促进细胞叶绿素浓度快速增长,而过度的剪切力会造成细胞物理损伤和叶绿素外泄或降解,造成细胞内叶绿素浓度的下降。Hejazi^[10]对杜氏盐藻(*Dunaliella Salina*)受剪切力作用的研究表明,细胞在受压状态下,光合体系尺寸会变小,从而引起叶绿素浓度减小。

2.2 连续剪切期间不同搅拌速率对氮、磷营养物质吸收的影响

本实验所用人工海水中 NO_3^- 、 PO_4^{3-} 是唯一的无机氮、磷源,是非常重要的限制性营养源。N 元素参与合成氨基酸和光合色素(如 chl a,藻蓝蛋白等),直接影响生物量和光合作用速率^[17];P 元素参与 ATP、NAD(P)H 和核酸的合成,用于细胞能量传递和遗传物质的合成^[18]。细胞生长和氮、磷源吸收密切相关,图 2、图 3 为分别为连续剪切期间不同搅

拌速率对氮、磷源吸收的影响。

从图 2 可以看出,连续剪切期间,90~180r/min 下,氮源吸收较对照样迅速增加,说明该范围内连续剪切力可以有效促进氮源吸收,但不同搅拌速率间无明显差异;270~1000r/min 下连续搅拌 1.5d,细胞出现略微氮释放现象,1.5d 之后,氮源吸收迅速增加。分析其原因,在配子体细胞体内存在可储存一定量氮的氮池,当细胞处在高压、高剪切、低营养等恶劣情况下,体内的氮就会被释放,供细胞应对恶劣条件所用^[19-20]。由此可见,突然产生的高剪切力(搅拌速率大于 270r/min 所产生的剪切力)环境对配子体细胞而言不利,但 1.5d 之后,细胞可以逐渐适应该环境,恢复正常氮吸收状态。

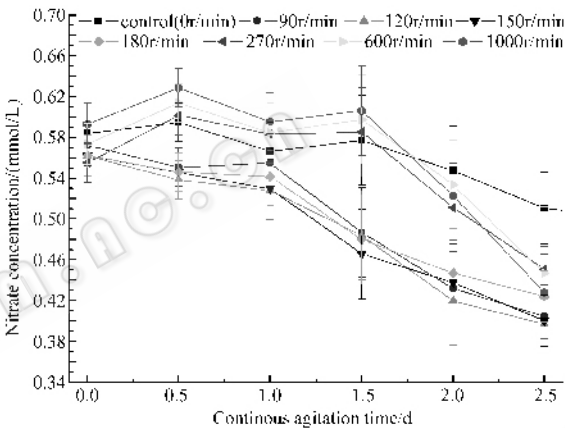


图 2 连续剪切期间不同搅拌速率对氮源吸收的影响

Fig. 2 Effect of agitation speed on nitrate concentration in continuous shear course

从图 3 可以更加明显的看出,90~180r/min 下,磷源吸收较对照样稍有增加或几乎持平;270~1000r/min 下,0.5d 之后出现明显的磷释放现象,以 1000r/min 最为明显,270 和 600r/min 在 1d 之后呈现磷吸收趋势。再次证明,270~1000r/min 产生的高剪切力对细胞生长不利。

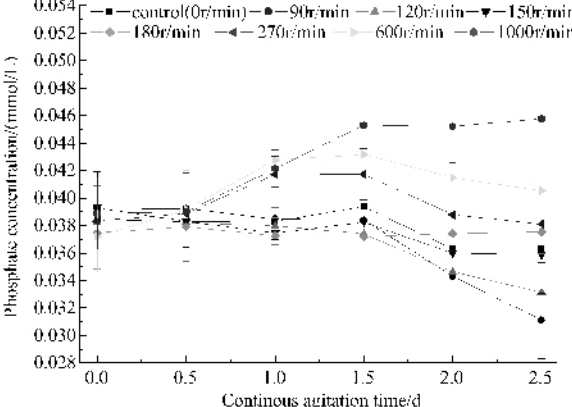


图 3 连续剪切期间不同搅拌速率对磷源吸收的影响

Fig. 3 Effect of agitation speed on phosphate

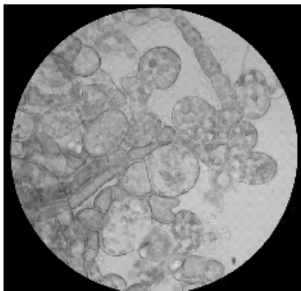


图 4 受剪切力损伤细胞团镜检照片

Fig. 4 Microscopic morphology of cell clump injured by shear stress

2.3 连续剪切期间不同搅拌速率对细胞损伤率和生理形态的影响

过度的剪切力会造成细胞损伤,破坏细胞壁结构,改变细胞膜通透性,从图 4 可以看出,过度剪切后,部分细胞形态改变,膨胀变大,叶绿素等内容物外泄。

表 1 不同搅拌速率对细胞损伤率的影响
Table 1 Effect of agitation speed on cell injury ratio

Agitation speed/(r/min)	Continuous agitation time/d	0	0.5	1	1.5	2	2.5
Control(0)		3.85%	3.15%	3.08%	4.07%	2.65%	3.54%
90		2.48%	4.34%	3.84%	4.65%	6.95%	8.07%
120		4.04%	5.46%	5.71%	7.34%	11.48%	13.61%
150		2.51%	4.89%	5.76%	12.47%	17.78%	22.38%
180		3.16%	4.94%	8.82%	13.37%	21.94%	28.49%
270		2.07%	6.79%	12.48%	19.37%	26.49%	43.31%
600		3.98%	8.61%	17.68%	24.59%	34.19%	50.62%
1000		2.67%	9.79%	23.52%	37.64%	49.17%	53.97%

图 5 为各搅拌速度下连续剪切 2.5d 后细胞叶绿素浓度、细胞干重、培养基内氮、磷源浓度以及细胞损伤率的比较。首先可以看出,细胞损伤率随搅拌速度变化曲线类似于 S 型曲线,当搅拌速度 < 90r/min 时,损伤率低于 8%;当搅拌速度从 270r/min 增加到 1000r/min,损伤率增加不超过 10%;损伤率增幅最明显的区域为搅拌速度 90 ~ 270r/min,说明海带配子体细胞对剪切力较为敏感,但对中高速搅拌产生的剪切力仍存在一定的耐受性。其次,细胞叶绿素浓度下降幅度同细胞损伤率增长幅度极其相似(搅拌速度 > 90r/min),由此证明,细胞叶绿素浓度的下降幅度可以较为准确的表征细胞受损伤程度,90r/min 时的叶绿素增长可以归结为剪切程度在一定范围内的正面效果;而不同搅拌速度下细胞干重(数据未给出)未表现明显差别,可能因为连续剪切造成部分细胞损坏或死亡,但该部分在干重测定中不能被体现,加之短期内细胞干重增量不明显,会造成较大误差。因此,在短期剪切期间,以细胞叶绿素

表 1 为不同搅拌速率下各取样时间测得的细胞损伤率。从表中可以看出,静止对照样的平均细胞损伤率 < 5%,可认为是细胞正常生理代谢损伤或死亡;90r/min 连续搅拌 2.5d,细胞损伤率仍可维持在 8% 之内,可认为其剪切力造成的附加损伤率很小;120 ~ 180r/min 连续搅拌 1d 之内,细胞损伤率几乎可以维持在 8% 之内,但随后其损伤率相继增大;270 ~ 1000r/min 下,损伤率从开始即迅速增大,且随搅拌速率增大而增加,1000r/min 连续搅拌 2.5d,细胞损伤率已达静止对照样的 18 倍。细胞损伤测定从显微方面再次证明,即使在短时间内,高速搅拌也会对细胞造成较大损伤。Cruz^[11]在优化昆虫细胞培养参数的研究中发现,搅拌速度大于 270r/min 所产生的漩涡和高水平的气泡捕获是造成细胞损伤的主要原因。

浓度作为生物量的指标较为合适。再者,连续剪切过程中,磷释放比氮释放现象明显,可能因为正常状态下氮池储存存在快速吸收和同化吸收两种方式,快速吸收一般发生在细胞进入新环境生长初期(数小时至几天),而同化吸收则反映了细胞内部氨基酸合成对氮源的需求,而且氮的吸收速率总体符合米氏曲线,而磷吸收速率基本符合一次曲线^[21]。因此,磷池存储量较大,相应地在恶劣条件下磷释放现象亦会更加明显。由此可见,除叶绿素等生物量指标外,氮、磷源吸收也可以作为连续剪切作用下配子体细胞受损情况的另一指标,其中,磷源释放程度更为有效的表达细胞受损情况。

2.4 卸载剪切力后配子体细胞的恢复情况
连续剪切 2.5d 后,卸载全部剪切力,所有组均在静止状态下恢复 23.5d。图 6 为不同搅拌速度下,连续剪切和恢复期间叶绿素曲线全图。在 90r/min 下,在恢复初期由于忽然撤除有利于细胞悬浮和均匀摄取光照及营养物质的条件,细胞生长速度比连

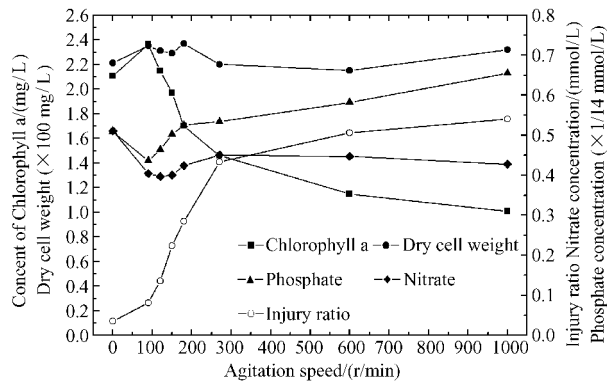


图5 连续剪切 2.5d 后各检测指标之间的比较
Fig. 5 Comparison of Indicators after 2.5 days' continuous agitation

续剪切期间稍显趋缓,但最终仍获得最大叶绿素浓度 3.56mg/L;120 ~ 180r/min 下,在连续剪切后期叶绿素浓度已见负增长的情况下,忽然卸载剪切力,细胞生长迅速恢复,叶绿素浓度分别在恢复 0 ~ 5.5d 和 5.5 ~ 11.5d 期间出现增长最高峰;270 ~ 1000 r/min 下,卸载剪切力后,细胞生长不能立刻恢复,在经历 0 ~ 4.5d 的停滞期后,叶绿素浓度逐渐增大,并在 11.5 ~ 17.5d 期间呈现最大比生长速率。恢复进入 17.5d 后,随着营养物质消耗殆尽,细胞生长速度渐缓。由此可见,卸载剪切力后细胞具有较强的恢复能力,高搅拌速度下细胞恢复稍有延滞,但仍可达到较大的比生长速率。Scragg^[22]对长春花和向日葵 (*Helianthus annuus*) 在不同搅拌速度下悬浮培养的研究表明,某些细胞系的剪切耐受力是可以在剪切力条件下培养获得的。

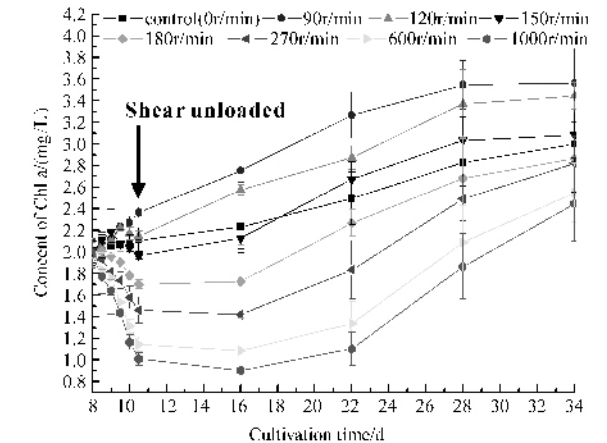


图6 不同搅拌速度下连续剪切和恢复期间的叶绿素曲线
Fig. 6 Content curve of cellular chlorophyll a in continuous agitation and recovery courses under different agitation speeds

3 结论

通过对海带配子体细胞进行短期连续剪切及卸

载剪切后恢复能力的研究,得出以下结论:

(1) 海带配子体对连续剪切力较为敏感。连续剪切 2.5d 后,细胞损伤率随搅拌速度的增加呈 S 型曲线,其中 90r/min(叶端线速度为 0.165m/s)左右为临界转速。一般而言,剪切力对配子体细胞有害,但适度的剪切力和连续剪切时间可以加强传质,过大的剪切强度或过长的剪切时间均会造成细胞叶绿素浓度负增长、胞内氮、磷释放、细胞损伤率上升、细胞显微形态变化等负面影响。

(2) 海带配子体具有很强的剪切损伤后的恢复能力。120 ~ 180r/min 下,卸载剪切力后细胞立即呈现出较强的叶绿素增长的恢复能力;270 ~ 1000r/min 下,细胞在卸载剪切力 4.5d 后恢复叶绿素增长。

(3) 在连续剪切实验中,海带配子体细胞出现大量细胞损伤或死亡,因此叶绿素浓度比干重更能有效的表达生物量浓度,除细胞损伤率外,磷源释放可以作为判别细胞受损的参考指标之一。

一般而言,剪切力对海带配子体有害,但适度的剪切对细胞的损伤较小,同时可以强化传质,因此培养过程中,可以采用间歇剪切培养方式(即剪切-恢复交替进行),为被剪切的细胞提供恢复时间。该法也可用于其他对剪切力敏感的植物细胞培养。但对于特定的培养细胞,需寻找临界搅拌速率、允许连续搅拌时间和足够的恢复时间。

REFERENCES 参考文献)

[1] Zhang Y(张亦陈). *In vitro* gene expression by using *Laminaria japonica* gametophyte propagation system[Doctor's Degree Thesis]. Qingdao: Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences(中国科学院海洋所), 2005.

[2] Jiang D(蒋德保). Research of suspension cultivation techniques of *Laminaria saccharina* gametophytic cells. *Jiangsu Food and Fermentation*(江苏食品与发酵), 2006, 12(2): 8-18.

[3] Vairappan CS, Suzuki M, Abe T, et al. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the *Okinawan laurencia* species. *Phytochem*, 2001, 58(3): 517.

[4] Qi H, Rorrer GL. Photolithotrophic cultivation of *Laminaria saccharina* gametophyte cells in a stirred tank bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 45(3): 251.

[5] Huang YM, Rorrer GL. Optical temperature and photoperiod for the cultivation of *Agardhiella subulata* microplantlets in a bubble column photobioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 79(2): 135.

[6] Liu JW(刘静雯), Dong SL(董双林). Nutrient metabolism and the major nutrient uptake kinetics of seaweeds. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2001, 37(4): 325.

[7] Zhao R(赵锐), Chen SY(陈思晔), Zhang BH(张宝红), et al. Effects of constant nitrate and phosphate concentration on perfusion culture of *Laminaria japonica* gametophytic cells in stirred-tank photobioreactor. *Chinese High Technology Letters*(高技术通讯), 2005, 15(11): 991-995.

- [8] Wang JX(王金霞). Studies on the production of pure phycocyanin by airlift alga photobioreactor[Master 's Degree Thesis]. Qingdao : Ocean University of China(中国海洋大学), 2002.
- [9] Liu CX(刘春朝), Wang Y(王玉春), Zheng Z(郑重), *et al.* Effects of shear stress on plant cell suspension cultures. *Engineering Chemistry and Metallurgy*(化工冶金), 1998, **19**(4) 380 – 381.
- [10] Hejazi MA, Andrysiewicz E, Tramper J, *et al.* Effect of mixing rate on β -carotene production and extraction by *Dunaliella Salina* in two-phase bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 2003, **84**(5): 591 – 596.
- [11] Cruz PE, Cunha A, Peixoto CC, *et al.* Optimization of the production of virus-like particles in insects cells. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **60**: 408 – 418.
- [12] Borowitzka MA, Larkum AWD. Calcification in Green Alga-Halimeda II the exchange of Ca^{2+} and the occurrence of age gradients in calcification and Photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 1976, **27**(100): 864 – 878.
- [13] Jeffrey SW, Humphrey GF. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher-plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen*, 1975, **167**(2): 191 – 194.
- [14] Collos Y, Mornet F, Sciandra A, *et al.* An optical method for the rapid measurement of micromolar levels of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J Appl Phycol*, 1999, **11**(2): 179.
- [15] Strickland JDH, Parsons TR. A Practical Handbook of Sea-water Analysis. Ottawa : Fisheries Research Board of Canada, 1968, pp. 49 – 56.
- [16] Miron AS, Garcia MCC, Gomez AC, *et al.* Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, **16**(3): 287 – 297.
- [17] Polzin JP, Rorrer GL. Halogenated monoterpene prduction by microplantlets of the marine red alga *Ochtodes secundiramea* within an airlift photobioreactor under nutrient medium perfusion. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **82**(4): 415 – 428.
- [18] Martinez ME, Jimenez JM, Yousfi FE. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour Technol*, 1999, **67**(3): 233 – 240.
- [19] Brezo M, Jose MR. Seasonal variation of P content and major N pools in palmaria palmate (Rhodophyta). *J Phycol*, 2002, **38**: 1082 – 1089.
- [20] Carballo-Cardenas EC, Tuan PM, Janssen M, *et al.* Vitamin E (alpha-tocopherol) production by the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta* and *Tetraselmis suecica* in batch cultivation. *Biomol Eng*, 2003, **20**(4 – 6): 139 – 147.
- [21] Americo IT, Monica NG, Jose LE. Nutrient uptake rates by the alien alga *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta) (Nuevo Gulf, Patagonia, Argentina) when exposed to diluted sewage effluent. *Hydrobiologia*, 2004, **520**: 1 – 6.
- [22] Scragg AH, Allan EJ, Leckie F. Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme Microbiology Technology*, 1988, **10**: 361 – 367.