

**ПРОДУКТИВНОСТЬ *SPIRULINA PLATENSIS* И *TETRASELMIS VIRIDIS* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

Проведено сравнение различных методов культивирования микроводорослей по критерию продуктивности. Показано, что продуктивность *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler и *Tetraselmis viridis* Rouch при использовании непропорционально-проточного метода культивирования в 1,5 раза выше, чем при квазинепрерывном методе выращивания.

Водоросли служат источниками растительного белка, витаминов, хлорофилл-каротиноидного комплекса, препаратов бактерицидного действия, иммуностимулирующих соединений и других веществ. Продукты из микроводорослей эффективно применяются в качестве кормовых добавок в животноводстве и марикультуре, используются в парфюмерии, медицине, пищевой промышленности [6, 15]. Для удовлетворения столь высокого спроса на биомассу водорослей требуются искусственные системы культивирования. Таких систем, исходя из принципа дешевизны и оптимальности условий среды, разработано огромное количество [11 - 14]. Кроме физико-химических условий среды и биологических особенностей культивируемого вида микроводоросли производительность биотехнологической системы определяется используемым методом культивирования.

В настоящее время на практике применяются следующие методы культивирования: накопительный, непрерывный, непропорционально-проточный, квазинепрерывный [3, 7, 9]. С теоретической точки зрения все перечисленные методы можно рассматривать как частные случаи квазинепрерывного. Это дает возможность использовать в математических расчетах теорию роста, предложенную в [7]. С практической точки зрения важны количество получаемой биомассы, ее качество и рентабельность применяемого метода.

Цель данной работы – провести сравнение величин продуктивности *Spirulina platensis* и *Tetraselmis viridis* при использовании накопительного, квазинепрерывного, непропорционально-проточного методов культивирования.

**Материал и методы.** В эксперименте использовали альгологически чистые культуры цианобактерии *Spirulina platensis* штамм IBSS-31 и зеленой жгутиковой микроводоросли *Tetraselmis viridis* штамм IBSS-25 из коллекции ИнБЮМ НАНУ [1].

Водоросли выращивали методами накопительных, квазинепрерывных и непропорционально-проточных культур [3, 7, 9] на питательных средах Заррука [5] для *S. platensis* и Тренкеншу [8] для *T. viridis*. Для приготовления питательной среды Заррука использовали дистиллированную воду, для среды Тренкеншу – морскую. Культиваторами служили стеклянные стаканы цилиндрической формы, высота слоя культуры составляла 3 см, объем – 300 мл. Этот объем поддерживали на протяжении всего эксперимента, доливая перед измерениями дистиллированную воду до отметки 3 см. Эксперимент проводился на люминостате с лампами ЛБ-40, которые давали среднюю освещенность дна каждого из стаканов 10 кЛк. Температуру стабилизировали на уровне 28 - 30°C. В процессе выращивания культуру непрерывно барботировали воздухом с помощью компрессорной установки.

Оптическую плотность при длине волны 750 нм использовали как косвенный показатель биомассы водорослей. Измерения проводили с помощью фотоэлектроколориметра КФК-2 в кювете 0,5 см. Переход от единиц оптической плотности ( $D_{750}$ ) к величине абсолютно сухого веса биомассы (АСВ) осуществляли посредством эмпирического

коэффициента  $k$ , равного  $0,73 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{ед.опт.пл}^{-1}$  для *S. platensis*;  $0,75 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{ед.опт.пл}^{-1}$  для *T. viridis*;  $ACB = k \times D_{750}$ .

Расчет максимальной продуктивности и начальной плотности культуры на линейном участке роста проводили аппроксимацией эмпирических данных, исходя из уравнения линейной зависимости [9]:

$$B = P_m \times t + B_0, \quad (1)$$

где  $B$  – концентрация биомассы,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$ ;  $P_m$  – продуктивность,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ ;  $t$  – время, сут;  $B_0$  – концентрация биомассы при  $t = 0$ ,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$ .

Расчет удельной скорости роста проводили по формуле:

$$\mu = \frac{P_m}{B} = \frac{P_m}{P_m \times t + B_0} = \frac{1}{t + \frac{B_0}{P_m}} \quad (2)$$

Расчет динамики биомассы в условиях непрерывного культивирования проводили по формуле [7]:

$$B = \frac{P_m}{\omega} - \left( \frac{P_m}{\omega} - B_p \right) e^{-\omega(t-t_p)}, \quad (B_p = P_m \times t_p + B_0) \quad (3)$$

где  $B_p$  – плотность культуры в момент  $t_p$  включения протока,  $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$ ,  $\omega$  – удельная скорость протока,  $\text{сут}^{-1}$ .

**Результаты.** На начальном этапе эксперимента водоросли выращивали накопительным методом. В ходе эксперимента наблюдали прирост биомассы *S. platensis* с  $0,04$  до  $2,74 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ , *T. viridis* с  $0,05$  до  $2,4 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . При этом выраженных лаг- и лог-фаз не отметили в связи с адаптированностью культур к условиям эксперимента. Продуктивность *S. platensis* превышала продуктивность *T. viridis* практически в два раза, поэтому культуры достигли стационарной фазы не одновременно, на седьмые и двенадцатые сутки соответственно.

Для полученных данных линейной фазы роста различных культур микроводорослей произвели аппроксимирующие расчеты методом наименьших квадратов с параметрами, заданными согласно (1), и вычислили основные характеристики роста культур в данных условиях (табл. 1).

**Таблица 1. Ростовые характеристики исследуемых культур микроводорослей**  
**Table 1. Growth characteristics of investigated cultures of microalgae**

Культура	$P_m, \text{г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$	$\mu_m, \text{сут}^{-1}$	$B_0, \text{г}\cdot\text{л}^{-1}$
<i>S. platensis</i>	0,45	1,3	0,68
<i>T. viridis</i>	0,18	0,6	0,48

Затем, эксперимент продолжили в квазинепрерывном режиме, с удельной скоростью протока  $0,2 \text{ сут}^{-1}$  для *S. platensis* с 10 дня и  $0,1 \text{ сут}^{-1}$  для *T. viridis* с 12 дня культивирования. Квазинепрерывный режим культивирования *S. platensis* организовали со стадии глубокого отмирания культуры с уровня плотности ( $2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ ) гораздо ниже расчетного для динамического стационарного равновесия. Наблюдали постепенное увеличение плотности культуры спирулины до расчетного уровня, затем превышение его до  $2,5 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$  и снижение до расчетных  $2,3 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . Культуру *T. viridis* начали разбавлять по завершению фазы замедления роста – величина плотности биомассы выше расчетного значения стационара на  $0,4 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . И наблюдали снижение плотности культуры ниже расчетного до  $1,73 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ , но с последующим возвращением к стационарному уровню плотности. Затем, культуру перевели в непропорционально-проточный режим. Последний характеризуется тем, что клетки и культуральная среда в отводимой суспензии находятся в ином соотношении, чем в культиваторе. В нашем случае плотность культур в культиваторах со-

ставляла  $2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ , а в отводимой суспензии  $4 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ . Это достигалось фильтрованием для *S. platensis* и центрифугированием для *T. viridis* с возвращением фильтрата и супернатанта в культиватор перед стандартной процедурой обмена. В результате плотность *T. viridis* не изменилась, а *S. platensis* незначительно снизилась.

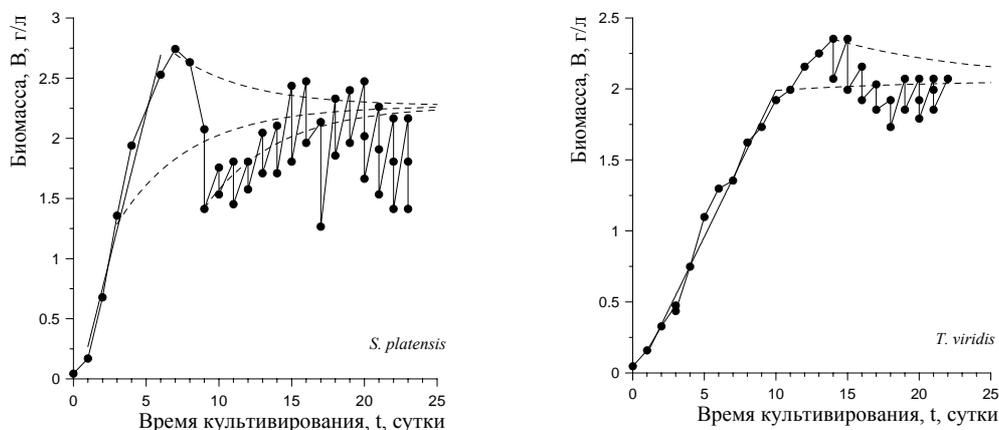
**Обсуждение.** Данные, полученные опытным путем на примере двух видов водорослей при допустимом уровне погрешности измерений, совпадают со значениями, прогнозируемыми математической моделью (табл. 2). Полученные цифры наглядно свидетельствуют о достоверности описания предложенной моделью [2] уровня динамического стационарного равновесия культуры при непрерывном режиме культивирования микроводорослей.

**Таблица 2. Сравнение плотности культур микроводорослей на экспериментально установленном и теоретически рассчитанном стационарном состоянии квазинепрерывной культуры**

**Table 2. Comparison of density of cultures of microalgae on experimentally established and theoretically calculated stationary condition queasycontinuous cultures**

Культура	$V_{st}$ расчетный, $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$	$V_{st}$ эмпирический, $\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$
<i>S. platensis</i>	2,28	$2,42 \pm 0,10$
<i>T. viridis</i>	2,06	$2,07 \pm 0,01$

Проведенные расчеты не учитывают некоторые существенные факторы, влияющие на рост микроводорослей, например, степень адаптации и автоселекцию. В связи с этим, переходный процесс от накопительной культуры к стационарной непрерывной не всегда адекватно описывается разработанной моделью. Этим можно объяснить несовпадение теоретических и эмпирических данных (рис. 1) на отрезке переходного процесса к стационарному этапу.



**Рисунок 1. Соответствие экспериментальных ростовых данных теоретическим расчетам на примере микроводорослей: *S. platensis*, *T. viridis***

**Figure 1. Conformity experimental growth data to theoretical calculations on an example of microalgae: *S. platensis*, *T. viridis***

Достоверное совпадение теоретических и эмпирических значений дает повод использовать разработанную модель для теоретической оценки продуктивности различных режимов культивирования микроводорослей: накопительного, квазинепрерывного,

непропорционально-проточного. Исторически сложилось, что в научно-исследовательских целях обычно применяют периодическую культуру водорослей в связи с простотой и небольшой трудоемкостью таких экспериментов. Менее распространенный квазинепрерывный метод культивирования обладает рядом ценных особенностей: возможностью стабилизировать все характеристики культуры, высокой воспроизводимостью результатов с заданной точностью, простым математическим аппаратом. Непрерывный метод позволяет поддерживать культуру альгологически чистой в нестерильных условиях производства и при достаточно небольших культуральных объемах в условиях лаборатории ежедневно получать большое количество биомассы для анализов. Квазинепрерывный и непропорционально-проточный методы незаменимы при исследовании ценологических взаимодействий между микроводорослями в искусственной культуре [4, 10]. С точки зрения организации производства, два последних метода более приемлемы для использования в промышленных условиях.

В промышленных условиях большое значение имеет производительность применяемого метода культивирования. Рассчитаем продуктивность на 5 дней для описанной системы культивирования микроводорослей различными методами (табл. 3).

**Таблица 3. Урожай при различных методах культивирования**  
**Table 3. A yield at various methods cultivation**

Метод	Культура, г·л <sup>-1</sup> ·сут <sup>-1</sup>	
	<i>S. platensis</i>	<i>T. viridis</i>
Расчет	2,27	0,90
Накопительный	2,36	0,98
Квазинепрерывный	2,40	0,98
Непропорционально-проточный	3,82	1,24

Периодический и квазинепрерывный методы, как видно из табл. 3, имеют близкую продуктивность, так как культивирование было организовано в рамках линейного роста, когда продуктивность одинакова и максимальна. Превышение теоретических значений продуктивности значениями эмпирических данных можно объяснить адаптационными и автоселекционными процессами. Непропорционально-проточный режим был организован так, чтобы при таком же протоке среды, как и при квазинепрерывном режиме, вынос биомассы был в два раза большим. Такой подход оправдывает себя при использовании плотных культур, когда фактором, лимитирующим рост, является обеспеченность световой энергией, а не субстратом. Плотные культуры применяются в условиях производства, для большей устойчивости культуры к неблагоприятным воздействиям и максимизации урожая, и в условиях лаборатории – для более точного определения ростовых зависимостей. Для данных условий можно рекомендовать непропорционально-проточный режим культивирования, способный обеспечить в 1,5 раза (см. табл. 3) более высокую продуктивность системы культивирования, чем пропорциональный квазинепрерывный режим.

**Выводы.** Для исследованных видов непропорционально-проточный метод культивирования позволяет при прочих равных условиях получить более высокую продуктивность, чем накопительный и квазинепрерывный методы.

1. Брянцева Ю. В., Дробецкая И. В., Харчук И. А. Характеристика цианобактерии *Spirulina (Arthrospira) platensis* // Экология моря. - 2006. - Вып. 70. - С. 24 - 30.
2. Геворгиз Р. Г., Боровков А. Б. Динамика биомассы *Dunaliella salina* в условиях непрерывного культивирования. // Экология моря. - 2005. - Вып. 67. - С. 35 - 37.
3. Кокова В. Е., Лисовский Г. М. Непропорционально-проточная культура простейших. - Новосибирск: Наука, 1976. – 76 с.
4. Левич А. П., Булгаков Н. Г. О возможности регулирования видовой структуры лабораторного альгоценоза // Изв. РАН. Серия биол. - 1993. - № 4. - С. 569.

5. Пиневиц В. В., Верзилин Н. Н., Михайлов А. А. Изучение *Spirulina platensis* — нового объекта для высокоинтенсивного культивирования // Физиол. раст. - 1970. - Т. 17, вып. 5.- С. 1037 - 1038.
6. Тренкениш Р. П. Одноклеточные водоросли: массовое культивирование и практическое использование // Прикладная альгология. - 1999. - № 1. - 3. - С. 7 - 10.
7. Тренкениш Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей II. Квазинепрерывная культура. // Экология моря. – 2005. - Вып. 67. - С. 98 – 110.
8. Тренкениш Р. П., Белянин В. Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. // – Биология моря. – 1979. - № 51. – С. 41 - 46.
9. Уильямсон М. Анализ биологических популяций. - М.: Мир. - 1975. – 271 с.
10. Фурсова П. В., Левич А. П. Математическое моделирование в экологии сообществ (обзорная информация ВИНТИ) // Проблемы окружающей среды. - № 9. – 2002. – 107 с.
11. Acien Fernandez F. G., Garcia Camacho F., Sanchez Perez J. A., Fernandez Sevilla J. M., Molina Grima E. A. Model for Light Distribution and Average Solar Irradiance Inside Outdoor Tubular Photobioreactors for the Microalgal Mass Culture // Biotechnology and bioengineering. - 1997. – 55. № 5. P. 701 - 714.
12. Borowitzka M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters // Journal of Biotechnology. - 1999. - 70. P. 313 – 321.
13. Garcia-Gonzalez M., Moreno J., Canavate J. P. & others. Conditions for open-air outdoor culture of *Dunaliella salina* in southern Spain // Journal of Applied Phycology. -2003. - 15. P. 177 – 184.
14. Ogbonna J. C., Tanaka H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation — Development of processes for efficient light utilization in photobioreactors // Journal of Applied Phycology. - 2000. - 12. P. 207 – 218.
15. Zilberman D., Caswell M. Algalculture. - Department of Agricultural and Resource Economics, University of California at Berkeley, 2000. - 100 p.

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь

Получено 05.10.2005

A. B. BOROVKOV, R. G. GEVORGIZ

**PRODUCTION *SPIRULINA PLATENSIS* AND *TETRASELMIS VIRIDIS*  
BY DIFFERENT METHODS CULTIVATION**

**Summary**

Possibility of forecasting of dynamics of microalgae's biomass in conditions of continuous cultivation using the elementary mathematical model is shown. Good conformity of experimental and theoretical data shows. Comparison of various methods cultivation is spent. The opportunity of reception of high efficiency of cultures of microalgae is ascertained at use of disproportionate-flowing method cultivation.