

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ГИДРОКАРБОНАТОВ И КАРБОНАТОВ В СРЕДЕ ЗАРРУКА ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ МИКРОВОДОРОСЛИ *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITLER В НАКОПИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Приводятся данные о карбонатном равновесии в среде Заррука, приготовленной на основе двух различных солей - NaHCO_3 и Na_2CO_3 , при выращивании водоросли *Spirulina platensis*. Приведены ростовые характеристики микроводоросли и ее средняя продуктивность в период максимального роста на данных средах.

Содержание углерода в питательной среде при культивировании *Spirulina platensis* является одним из важных факторов, определяющих продуктивность культуры. Для выращивания этой водоросли наиболее оптимальной признана среда Заррука [5, 6, 9], в которой гидрокарбонаты составляют около 76 % от суммы всех солей. Исследование характера изменения концентраций гидрокарбонатов и карбонатов ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$) в среде представляет интерес для оценки потребности водоросли в углероде и ее способности использовать карбонаты в качестве источника углерода. Учитывая выше изложенное, мы поставили задачу определить направленность динамики карбонатного равновесия в питательной среде при выращивании *S. platensis* методом накопительной культуры в среде Заррука, приготовленной на основе гидрокарбоната натрия, и среде Заррука, содержащей вместо гидрокарбоната натрия эквивалентное по углероду количество карбоната натрия, а также оценить характер влияния ионных форм CO_2 на ростовые характеристики и продуктивность данной микроводоросли.

Материал и методы. Объектом исследования была *Spirulina platensis* из коллекции отдела биотехнологии и фиторесурсов ИнБЮМ НАН Украины. Водоросли выращивали методом накопительной культуры в однотипных колбах объемом 1 л на люминистате при непрерывном освещении снизу. Интенсивность освещения измеряли люксметром Ю – 116. Суспензию микроводорослей барботировали воздухом со скоростью 80,4 л/ч с помощью аквариумного насоса. Эксперимент проведен дважды: в осенний и зимний периоды. Условия проведения экспериментов приведены в таблице.

Таблица. Условия проведения экспериментов
Table. Experimental conditions

Дата проведения эксперимента	Температура, °С	Освещенность, кЛк	Длина светового дня	Высота слоя суспензии водоросли, см	Начальная оптическая плотность D_{750} , опт.пл.
22.10.2001	28 - 31	5,0 - 5,2	9 ч 59 мин	5,5	0,05
12.11.2001			8 ч 30 мин		
14.01.2002	26 - 28	5,2 - 5,4	7 ч 36 мин	5,5	0,15
23.01.2002			8 ч 05 мин		

Эксперименты проведены в 2 вариантах:

А) спирулину выращивали на стандартной среде Заррука (NaHCO_3 -16,8 г/л) (гидрокарбонатная среда Заррука);

В) в среде Заррука NaHCO_3 заменили эквивалентным по углероду количеством Na_2CO_3 (21,17 г/л) (карбонатная среда Заррука).

Инокулят спирулины, выращенный методом накопительной культуры, объемом 50 мл, внесли в каждую колбу. Оптическую плотность измеряли на КФК-2 в кюветах при длине волны 750 нм с рабочей длиной 0,5 см. Для предварительной оценки продуктивности спирулины было использовано уравнение зависимости между оптической

плотностью культуры в области 750 нм и содержанием сухого вещества в литре суспензии водоросли, рассчитанное методом наименьших квадратов для данного штамма спироулины [3]. Среднее значение максимальной продуктивности культуры в опытах оценивали по тангенсу угла наклона прямолинейного участка кривой роста по формуле $X = P \cdot t + B$, где X-биомасса в г/л, P-продуктивность в г/л-сутки, t-время в сутках.

Контроль pH среды осуществлялся при помощи иономера ЭВ-74. Содержание HCO_3^- и CO_3^{2-} в среде определялась алкалиметрическим методом [1]. На точность определения данных ионов в среде оказывали влияние следующие факторы: присутствие кислых солей (NaH_2PO_4 -0,5г/л) и образующееся, вследствие диссоциации, фосфатное равновесие: $\text{HPO}_4^{2-} + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{PO}_4^{3-} + \text{H}_2\text{O}$; высокая ионная сила раствора; вторичные метаболиты микроводорослей.

Для уменьшения указанных факторов, пробы предварительно отфильтровывали и среду разводили в 2 раза. Для более точного определения точки эквивалентности во время титрования через пробу пропускался воздух, освобожденный от CO_2 .

Отбор проб для определения плотности культуры проводили ежедневно в одно и то же время. Для компенсации испарения уровень раствора в колбах предварительно доводили до метки 550 мл дистиллированной водой и при перемешивании отбирали пробу объемом 5 мл из каждой колбы.

Результаты и обсуждение. Характер динамики биомассы и продуктивности данной микроводоросли, выращенной на среде Заррука, в двух вариантах (А, В), представлен на рис. 1 и 2.

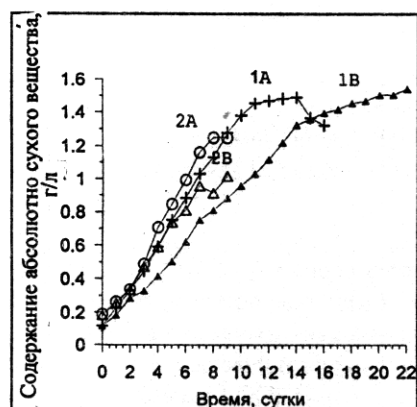


Рисунок 1. Динамика биомассы *Spirulina platensis* при выращивании на гидрокарбонатной (А) и карбонатной (В) среде Заррука в экспериментах № 1 и № 2

Figure 1. The biomass dynamic of *Spirulina platensis* growth in carbonate (B) and hydrocarbonate (A) Zarrouk medium in experiments No1 and No 2

Кривые роста спироулины двух вариантов, как в первом, так и во втором экспериментах, существенно отличались между собой. Выход водоросли на стационарную фазу роста в первом случае соответствовало 12-му (для варианта А) и 16-му (для варианта В), во втором – 7-му дню. Возможно, что различия в кривых роста спироулины в двух вариантах (А, В) вызваны ухудшением питания в варианте В и связаны с неоптимальными условиями выращивания (pH) [7].

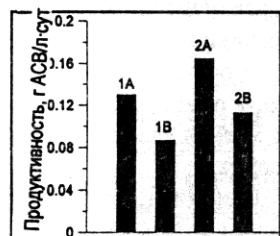


Рисунок 2. Максимальная продуктивность *Spirulina platensis* при выращивании на гидрокарбонатной (А) и на карбонатной (В) среде Заррука в экспериментах № 1 и № 2

Figure 2. Maximum productivity of *Spirulina platensis* in carbonate (B) and hydrocarbonate (A) Zarrouk medium in experiments No 1 and No 2

Продуктивность спироулины, выращенной на карбонатной и гидрокарбонатной средах, существенно различалась. Средняя (для линейного участка кривой роста) про

дуктивность культуры в первом эксперименте за 11 дней составила: 0,128 г/л-сутки - для варианта А и 0,09 г/л-сутки - в варианте В. В повторном эксперименте продолжительностью 9 дней она равнялась для варианта А - 0,145 г/л · сутки, для варианта В - 0,113 г/л-сутки. Несовпадение величин продуктивности, полученных в разных повторностях, объясняются различиями в условиях проведения экспериментов (температура, исходная плотность культуры, длина светового дня). Изменение концентрации карбонатов и гидрокарбонатов, а также pH в варианте А обоих экспериментов показаны на рис.3.

Несмотря на некоторые отличия в условиях выращивания, характер содержания HCO_3^- и CO_3^{2-} сходен. По мере накопления биомассы содержание гидрокарбонатов в сре-

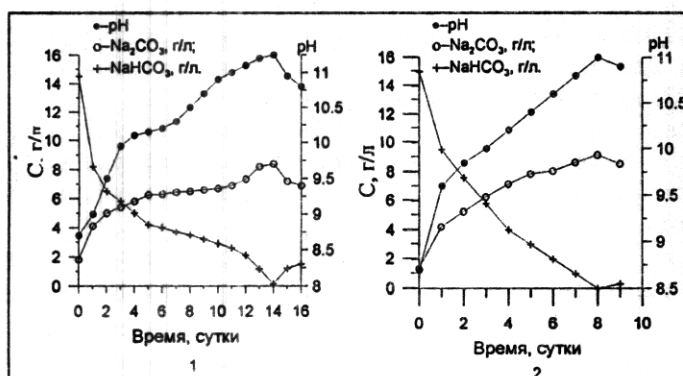
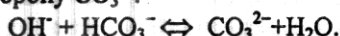


Рисунок 3. Динамика содержания карбонатов, гидрокарбонатов и pH при выращивании спирулины на гидрокарбонатной среде Заррука в экспериментах № 1 и № 2

Figure 3. Carbonates, hydrocarbonates and pH dynamics during *Spirulina platensis* growth in hydrocarbonate Zarrouk medium in experiments No 1 and No 2

де существенно снижается. Максимальное снижение регистрируется в первые сутки. Минимальные концентрации соответствуют выходу культуры на стационарную фазу роста. Падение концентрации гидрокарбонат-ионов сопровождается ростом pH среды и увеличением содержания карбонат-ионов, что связано со сдвигом карбонатного равновесия в сторону CO_3^{2-} :



Максимальный рост карбонатов наблюдался в первые 4 - 5 дней и затем оставался практически неизменным, даже когда HCO_3^- были полностью ассимилированы. Накопление в среде карбонатов в первые дни и стабилизация их уровня в последующее время наводят на мысль, что из всех доступных неорганических форм углерода

(HCO_3^- , CO_3^{2-}) спирулина в качестве основного источника данного биогена использует гидрокарбонат-ионы. При переходе культуры на стационарную фазу роста наблюдается обратный процесс: концентрация карбонатов уменьшается, а гидрокарбонатов увеличивается. Данный процесс связан со сдвигом карбонатного равновесия в сторону HCO_3^- при отмирании культуры, снижении pH и увеличении роли CO_2 воздуха.

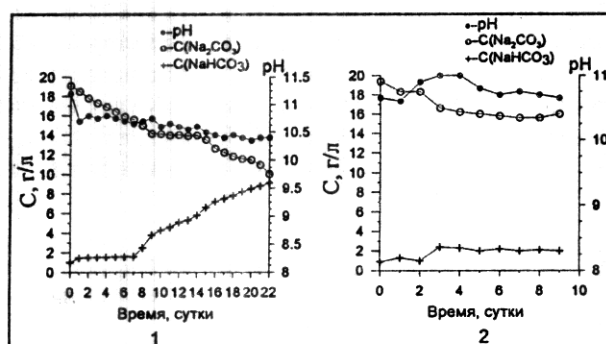


Рисунок 4. Динамика содержания карбонатов, гидрокарбонатов и pH при выращивании спирулины на карбонатной среде Заррука в экспериментах № 1 и № 2

Figure 4. Carbonate, hydrocarbonate and pH dynamics during *Spirulina platensis* growth in carbonate Zarrouk media in experiments No 1 and No 2

Динамика карбонатов, гидрокарбонатов и pH при выращивании спирулины на карбонатной среде Заррука представлена на рис 4.

Динамики содержания карбонатов и гидрокарбонатов при выращивании спирулины на карбонатной среде Заррука обоих экспериментов носят сходный характер. За первые 8 - 9 дней активного роста микроводоросли общее содержание неорганического углерода уменьшилось в первом эксперименте на 3 г/л, во втором - на 2 г/л. В последующие дни до выхода культуры на стационарную фазу роста содержание общего количества карбонатов и гидрокарбонатов оставалось практически неизменным, тогда как концентрация последних увеличивалась, а CO_3^{2-} уменьшалась. Столь незначительное снижение концентрации общего неорганического углерода в период максимального роста биомассы микроводоросли, наводит на мысль о дополнительном источнике углерода, которым мог быть CO_2 воздуха, образующий в данной среде дополнительный источник гидрокарбонатов. Для подтверждения полной ассимиляции CO_2 воздуха в карбонатной среде Заррука был проведен дополнительный опыт. В тех же условиях через чистую карбонатную среду Заррука, с такой же скоростью продувался воздух в течение 5 дней. Результаты данного опыта представлены на рис. 5.

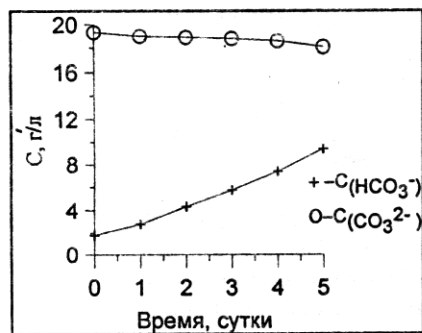


Рисунок 5. Динамика концентрации CO_3^{2-} и HCO_3^- в карбонатной среде Заррука при продувании воздуха 80,4 л/ч

Figure 5. Dynamics of CO_3^{2-} and HCO_3^- concentrations in carbonate Zarrouk medium under aeration with the speed of 80,4 l/h

За данное количество дней в среде содержание гидрокарбонатов увеличилось на 6,37 г/л, тогда как содержание карбонатов уменьшилось на 1,32 г/л, что может происходить только за счет растворения CO_2 воздуха в среде.

По всей вероятности, количество образующихся таким способом гидрокарбонатов было достаточным для роста биомассы микроводоросли. Накопление в среде HCO_3^- позволяет предположить, что снижение продуктивности в данном варианте не связано с углеродным голоданием микроводоросли в среде. Это отличие у спирулины, выращенной на двух различных средах, вероятно, связано с влиянием неоптимальных условий среды на микроводоросль. На протяжении всего эксперимента pH среды варьировало от 11,5 до 10,5, тогда как оптимальными для спирулины считаются pH 9,0 - 9,5 [8, 7].

Необходимо отметить внешние отличия спирулины, выращенной на карбонатной и на гидрокарбонатной средах Заррука. На гидрокарбонатной среде Заррука трихомы имели палочкообразную форму и были равномерно распределены по всему объему, на карбонатной среде трихомы имели спиралевидную форму и легко отделялись от среды, образуя покрытые слизью скопления. Различались культуры и по цвету: спирулина, выращенная на карбонатной среде, приобрела не характерный для нее травянисто-зеленый оттенок.

Заключение. Выращивание *Spirulina platensis* на среде Заррука, основу которой составляют гидрокарбонаты, сопровождается падением концентрации последних, накоплением карбонатов и ростом pH в период активного роста микроводоросли. Из доступных ионных форм CO_2 в данной среде спирулина предпочитает HCO_3^- . После достижения водорослью стационарной фазы роста наблюдается обратный процесс: концентрация карбонат-ионов снижается, а концентрация гидрокарбонат-ионов начинает расти. Это связано со сдвигом карбонатного равновесия в сторону гидрокарбонатов, что вызвано отмиранием культуры, снижением pH и увеличением роли ассимиляции CO_2 воздуха. При выращивании данной микроводоросли на среде Заррука, основу которой образуют карбонаты, основным источником неорганического углерода становится CO_2 воздуха, ассимилированный средой благодаря высоким pH. В качестве дополнительного источника углерода в первые 8 - 9 дней использовались гидрокарбонаты, образующиеся вследствие смещения карбонатного равновесия в сторону HCO_3^- .

Максимальная продуктивность микроводоросли, достигнутая в экспериментах, соответствует 0,145 г/л · сутки в среде Заррука на гидрокарбонатах и 0,113 г/л · сутки в среде Заррука на карбонатах. Отличие в продуктивности, а также во внешнем виде спиролины, выращенной на двух различных средах, вероятно, связано с выходом pH за пределы оптимального диапазона.

1. Лурье Ю. Ю. Унифицированные методы анализа вод. - Москва: Химия, 1972. - 304 с.
2. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. - Москва: Химия, 1965. - 390 с.
3. Минюк Г. С., Тренкеншу Р. П., Алисиевич А. В. и др. Влияние селена на рост микроводоросли *Spirulina platensis* (Nords.) в накопительной и квазинепрерывной культурах // Экология моря. - 2000. - Вып. 54. - С. 42 - 47.
4. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. - Москва: Мир, 1978. - 333 с.
5. Belay A. Mass culture of *Spirulina* Outdoors - The earthrise farms experience. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell biology and biotechnology. - London: Taylor & Francis, 1997. - P. 131 - 159.
6. Richmond A. Large-scale microalgal culture and applications // Progress in Phycological Research. - 1990. - 7.
7. Romano I., Bellitti M. R., Nicolaus B. et al. Lipid profile: a useful chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus // Phytochemistry. - 2000. - 54, №3. - P. 289 - 294.
8. Vonshak A. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, cell-biology and biotechnology. - London: Taylor & Francis, 1997. - P. 43 - 65.
9. Zarrouk C. Contribution a l'etude d'une cyanophycee. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina platensis* // Ph.D. thesis. - Paris, 1996. - 138 p.

Институт биологии южных морей НАНУ,
г. Севастополь

Получено 20.04.2002

A. V. BORODINA

DYNAMICS OF HYDROCARBONATES AND CARBONATES CONTENTS
IN THE ZARROUK MEDIUM BY *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITLER
GROWING IN THE BATCH CULTURE

Summary

Data on carbonate contents in Zarrouk media used for the growth of microalga *Spirulina platensis* are given. Zarrouk medium was prepared on the base of different salts (NaHCO_3 and Na_2CO_3). The growth characteristics of *S. platensis* and its mean productivity in the period of maximum growth in these media are reported.