



УДК 579:582.26/.27:577.1:519.2

ЛИНЕЙНЫЙ РОСТ МОРСКИХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В КУЛЬТУРЕ

© 2018 г. Р. П. Тренкеншу, А. С. Лелеков, Т. М. Новикова

Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

E-mail: nowtanj@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.06.2017. Принята к публикации 05.03.2018.

Предложено новое объяснение линейного роста плотности культур микроводорослей. Получены уравнения, описывающие зависимость коэффициента поглощения света и удельной скорости синтеза биомассы от концентрации хлорофилла а. Рассчитан удельный коэффициент экстинкции для культуры *Tetraselmis viridis*, который составил $0,008 \text{ мг} \cdot \text{м}^{-2}$ хлорофилла а.

Ключевые слова: коэффициент поглощения света, удельная скорость роста, хлорофилл а

Многочисленными экспериментальными исследованиями показано, что рост микроводорослей в накопительной культуре характеризуется наличием линейного участка (линейной фазы роста). Этот участок имеет относительно большую протяжённость во времени, а плотность культуры иногда увеличивается в десятки раз. Такой рост связан с постоянством скорости продукции биомассы. В качестве примеров можно привести накопительные кривые роста зелёной галофильной микроводоросли *Dunaliella salina* [7], морской диатомеи *Phaeodactylum tricornutum* [8], красной одноклеточной водоросли *Porphyridium purpureum* [1] и других видов [5, 9]. Механизм явления линейного роста неизвестен. Возможно, линейный участок роста является результирующим аспектом относительно большого количества воздействующих факторов, которые обуславливают кажущееся постоянство скорости роста. Однако во всех приведённых примерах лимитирующим скорость роста фактором не может являться минеральное питание. В то же время самый вариабельный фактор — световые условия, в которых находятся клетки микроводорослей. Наиболее вероятным представляется, что изменяющиеся световые условия по-разному воздействуют на скорости синтеза тех или иных биохимических составляющих клеток, приводя в итоге к постоянству скорости роста. Независимо от механизма, обеспечивающего линейный рост, постоянство скорости роста позволяет относительно простыми способами управлять биохимическим составом получаемой биомассы в довольно широком диапазоне. Это свойство очень удобно в практическом плане: без потери продуктивности можно выбрать такую плотность непрерывной культуры, при которой на выходе будет получена биомасса с заданным биохимическим составом.

Исходя из вышесказанного, представляется актуальным выявить зависимость синтеза плотности культуры микроводорослей и содержания биохимических компонентов в клетках микроводорослей в границах линейного участка накопительной кривой роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Показано [4], что нормированные скорости роста, в случае светового лимитирования, определяются приведённой плотностью потока энергетического субстрата λ_i :

$$P_{norm} = \mu_{norm} = \lambda_i,$$

$$\lambda_i = \frac{\varphi_e \cdot I_n}{\mu_e \cdot F_0},$$

где μ_{norm} — нормированная удельная скорость синтеза биомассы (безразмерная величина); I_n — плотность потока квантов фотосинтетически активной радиации (ФАР), поглощаемых культурой, $\text{квант} \cdot (\text{м}^2 \cdot \text{с})^{-1}$; φ_e — число молекул макроэрга, восстанавливаемых за счёт одного кванта, $\text{мол} \cdot \text{квант}^{-1}$; μ_e — активность ключевого комплекса, регулирующего энергообмен в клетке, $1 \cdot \text{с}^{-1}$; F_0 — число ключевых регуляторов энергообмена, приходящееся на единицу освещаемой поверхности культуры, $\text{мол} \cdot \text{м}^{-2}$.

В контексте данной работы величина F_0 есть некоторый фермент или транспортная система (лимитирующее звено), ограничивающая скорость образования первичных углеводов, которые синтезируются в цикле Кальвина при высоких (насыщающих) интенсивностях света. Величина F_0 является неким белковым комплексом, количество которого можно линейно связать с поверхностной концентрацией хлорофилла а:

$$F_0 = \chi \cdot \pi,$$

где χ — коэффициент связи, $\text{мол} \cdot \text{мг}^{-1}$, π — поверхностная концентрация хлорофилла а, $\text{мг} \cdot \text{м}^{-2}$.

Последнее предположение подтверждается экспериментально: для многих видов микроводорослей обнаруживается прямая пропорциональная зависимость между концентрацией общего белка и хлорофилла а (рис. 1).

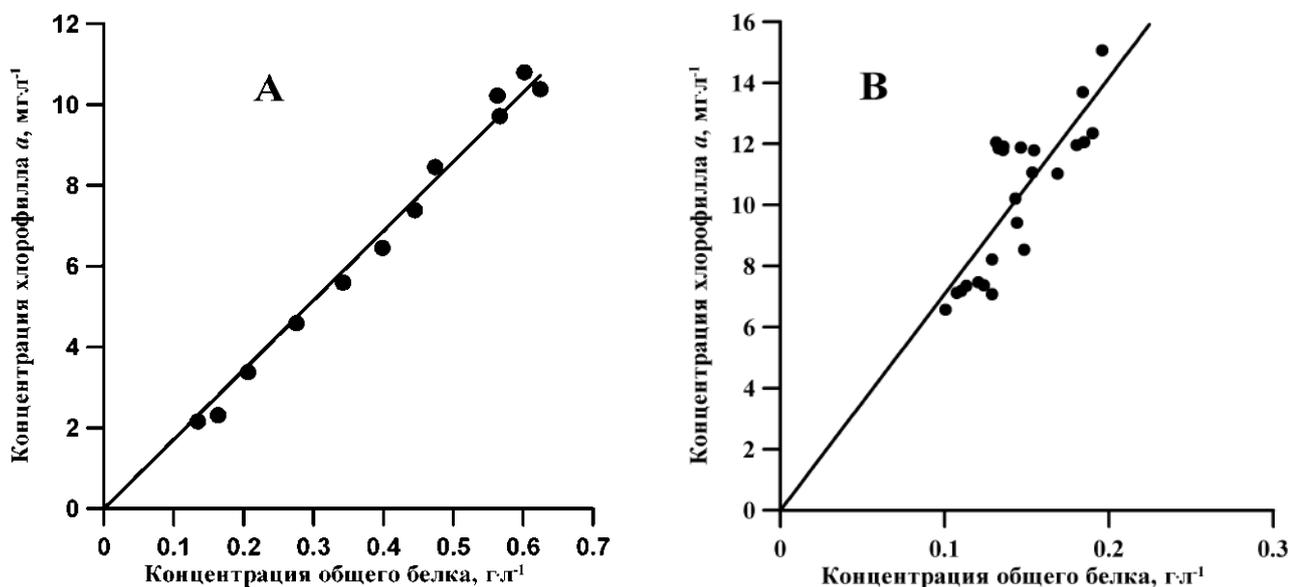


Рис. 1. Линейная зависимость между концентрацией общего белка и хлорофилла а. А — *Arthrospira (Spirulina) platensis* [2]. В — *Tetraselmis viridis*

Fig. 1. A linear relation between the concentration of total protein and chlorophyll a. А — *Arthrospira (Spirulina) platensis* [2]. В — *Tetraselmis viridis*

При условии полного светового обеспечения приведённая плотность потока квантов больше либо равна единице, при этом нормированная скорость также равна единице:

$$\lambda_i = \frac{\varphi_e \cdot I_{sat}}{\mu_e \cdot F_0} = 1,$$

где I_{sat} — насыщающая плотность потока квантов, поглощаемых культурой, $\text{квант} \cdot (\text{м}^2 \cdot \text{с})^{-1}$.

Из последнего уравнения можно определить величину I_{sat} , а следовательно, выразить неизвестные величины μ_e , φ_e и F_0 через измеряемый параметр:

$$I_{sat} = \frac{\mu_e \cdot F_0}{\varphi_e} = \frac{\mu_e \cdot \chi \cdot \pi}{\varphi_e}.$$

Теперь величину приведённой плотности потока субстрата можно представить в следующем виде:

$$\lambda_i = \frac{I_n}{I_{sat}}.$$

Учитывая энергию одного кванта, запишем выражение для приведённой плотности потока субстрата через величину поглощённой энергии I :

$$\lambda_i = \frac{I_n \cdot hv}{I_{sat} \cdot hv} = \frac{I}{I_{sat}}.$$

Учитывая последнее соотношение, можно заключить, что нормированная скорость роста культуры микроводорослей зависит от поглощённой световой энергии в виде ломанной (рис. 2):

$$\mu_{norm} = \frac{I}{I_{sat}} = \frac{\alpha \cdot I_0}{I_{sat}}, \quad (1)$$

где α — коэффициент поглощения света, I_0 — облучённость поверхности фотобиореактора.

Из литературных данных [3] следует, что коэффициент поглощения света культурой микроводорослей α пропорционален средней поверхностной концентрации хлорофилла *a* и описывается уравнением Бугера — Ламберта — Бера (рис. 3). Однако вследствие высокой гетерогенности культуры микроводорослей, а также рассеяния света в культурах высокой плотности, наблюдаются значительные отклонения от линейной зависимости между оптической плотностью и биомассой [6]. Применимость уравнения Бугера — Ламберта — Бера при определении биомассы микроводорослей по оптической плотности культуры вызывает множество вопросов, особенно для области больших концентраций клеток (рис. 3).

Более точно зависимость α от поверхностной концентрации хлорофилла *a* описывается уравнением, которое может быть получено на основе подхода, предложенного в [6]: известно, что одна клетка поглощает около 40 % падающей световой энергии, следовательно, поглощение света культурой в целом определяется числом клеток в одном монослое, их количеством, а также размерами клеток. Таким образом, взаимосвязь коэффициента поглощения света с поверхностной концентрацией хлорофилла *a* можно представить в виде:

$$\alpha \cong \frac{k\pi + (k\pi)^2}{1 + k\pi + (k\pi)^2}. \quad (2)$$

Как видно на рис. 2, для высоких концентраций хлорофилла уравнение (2) с более высокой точностью ($R^2 = 0,998$), чем закон Бугера — Ламберта — Бера, описывает кривую коэффициента поглощения. Коэффициент k в уравнении (2) равен $0,008 \text{ м}^{-2} \cdot \text{мг хл. а.}$

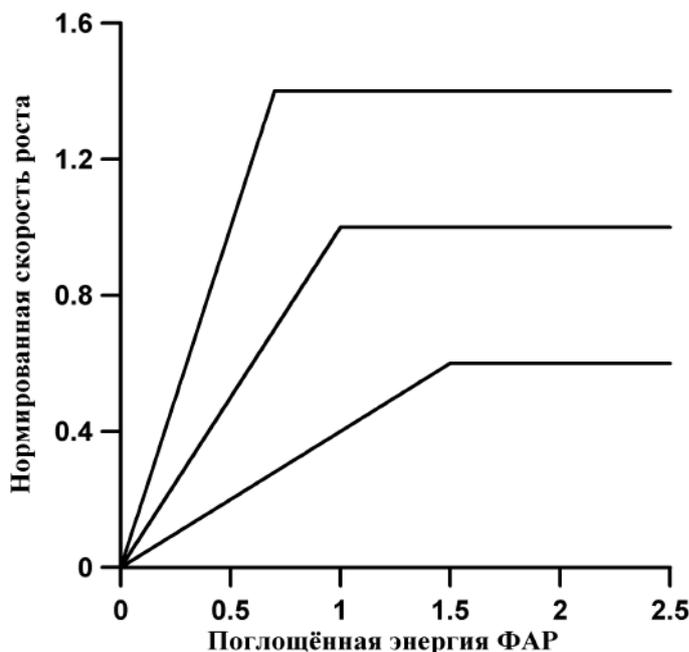


Рис. 2. Зависимость нормированной скорости роста от приведённой плотности светового потока при различном содержании хлорофилла a

Fig. 2. The dependence of the normalized growth rate on the luminous flux density at different chlorophyll a concentrations

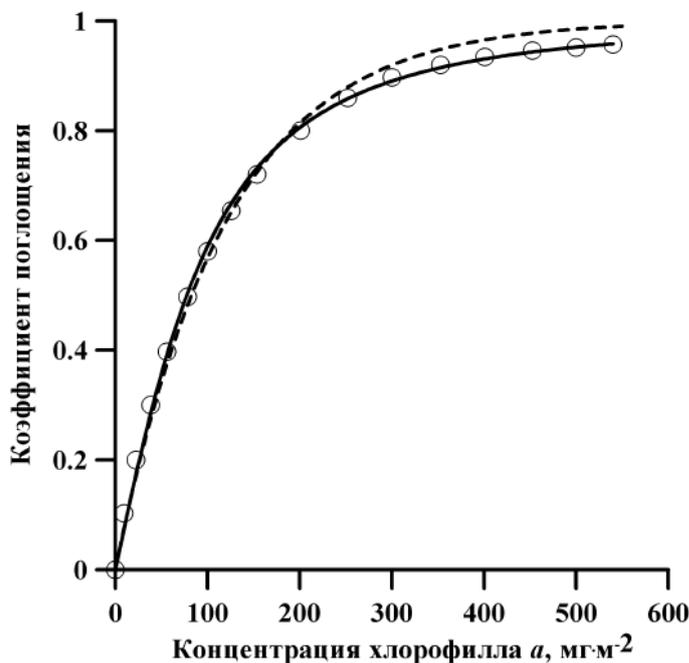


Рис. 3. Зависимость коэффициента поглощения от поверхностной концентрации хлорофилла a [3]. Пунктирная кривая — аппроксимация экспериментальных данных законом Бугера — Ламберта — Бера. Сплошная линия — аппроксимация экспериментальных данных уравнением (2). Значения коэффициентов см. в тексте

Fig. 3. The dependence of the absorption coefficient on the surface concentration of chlorophyll a [3]. Dotted curve is the approximation of experimental data by the Bouguer – Lambert – Beer's law; solid line is the approximation of experimental data by the equation (2). The values of the coefficients are in the text of the paper

Теперь выражение (1) для удельной скорости роста культуры можно записать в виде:

$$\mu_{norm} = \frac{I}{I_{sat}} = \frac{\alpha \cdot I_0}{I_{sat}} = \frac{I_0}{\frac{\mu_e \cdot \chi \cdot \pi}{\varphi_e}} \cdot \frac{k\pi + (k\pi)^2}{1 + k\pi + (k\pi)^2}.$$

Методом размерностей, с учётом энергии одного кванта, можно показать, что:

$$\frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot \chi} = \frac{1}{k}.$$

Теперь выражение для нормированной удельной скорости можно представить в виде:

$$\mu_{norm} = \frac{\varphi_e \cdot I_0}{\mu_e \cdot \chi \cdot \pi} \cdot \frac{k\pi + (k\pi)^2}{1 + k\pi + (k\pi)^2} = \frac{1}{k\pi} \cdot \frac{k\pi + (k\pi)^2}{1 + k\pi + (k\pi)^2}.$$

$$\mu_{norm} = \frac{k\pi + k\pi}{1 + k\pi + (k\pi)^2},$$

$$\mu^0 = \mu_{max}^0 \frac{k\pi + k\pi}{1 + k\pi + (k\pi)^2}. \quad (3)$$

Мы получили зависимость удельной скорости синтеза биомассы от концентрации хлорофилла а, из чего следует, что изменение пигментного состава клеток микроводорослей приводит к изменению удельной скорости роста культуры. Коэффициент в уравнении предлагаемой модели (3) есть произведение экстинкции хлорофилла а и толщины слоя культуры. Если фотобиореактор не плоскопараллельного типа, то толщина слоя культуры будет изменяться, что значительно усложнит математические выкладки. Для верификации полученных модельных представлений рассмотрим экспериментальные данные по выращиванию культуры *Dunaliella salina* в накопительном режиме [7] (рис. 4).

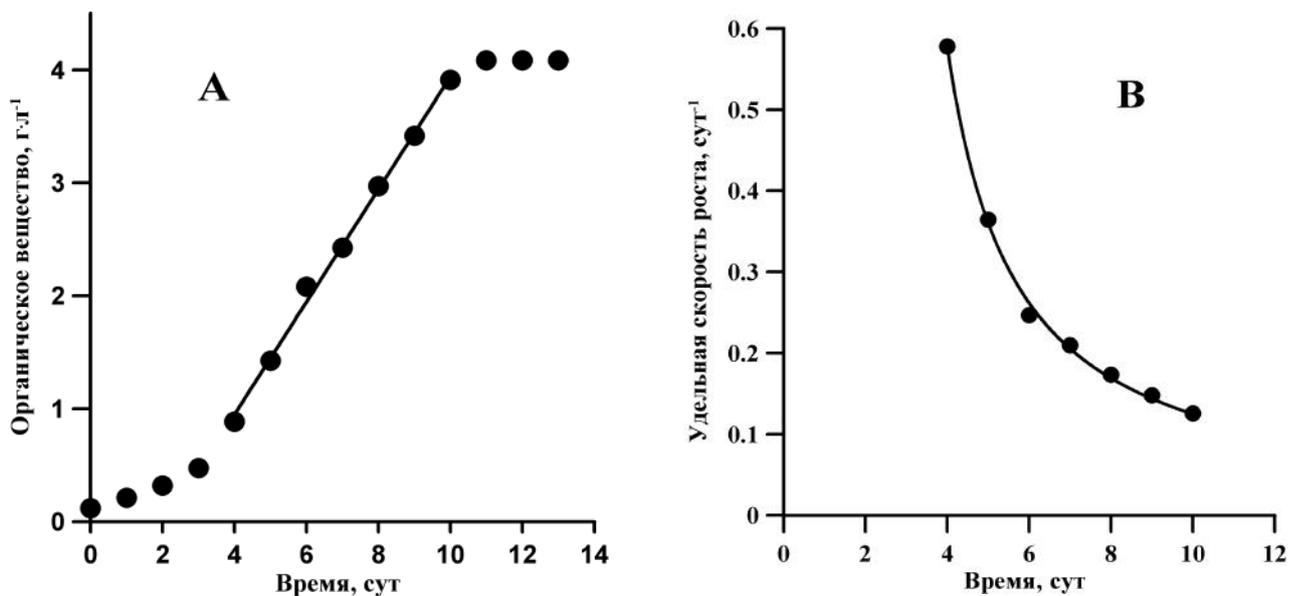


Рис. 4. А — накопительная кривая роста культуры *Dunaliella salina* [7]. Линия — аппроксимация линейной фазы роста. В — зависимость удельной скорости роста от времени для линейной фазы роста. Линия — расчётная кривая. Уравнения и значения коэффициентов см. в тексте

Fig. 4. А – batch growth curve of *Dunaliella salina* culture [7]; the line is the approximation of the linear growth phase. В – dependence of specific growth rate on the time for the linear growth phase; the line is the calculated curve. Equations and values of the coefficients are in the text of the paper

Линейный участок накопительной кривой отмечается в период с четвертых по десятые сутки. В рамках границы этого участка среднее значение максимальной продуктивности составляло $0,5 \text{ г (ОВ)} \cdot (\text{л} \cdot \text{сут})^{-1}$, а удельная скорость роста снижалась по гиперболическому закону. Приведём уравнения, с помощью которых можно описать данный участок кривой:

$$B = 0,88 + 0,5 \cdot (t - 4),$$

$$\mu = \frac{0,5}{0,88 + 0,5 \cdot (t - 4)}.$$

Учитывая, что используемая питательная среда обеспечивает рост культуры до плотности 4–6 г (ОВ) · л⁻¹ [8], можно заключить, что на выбранном диапазоне плотностей элементы минерального питания и газовое обеспечение не являются лимитирующими факторами. Таким образом, можно предположить, что постоянная продуктивность и, как следствие, снижение удельной скорости роста обусловлены световыми условиями, в которых находятся клетки. За счёт самозатенения клеток в растущей культуре количество падающей на клетку энергии ФАР снижается. На рис. 5 приведены зависимости удельной скорости роста от плотности культуры и от концентрации хлорофилла а. Сравнивая эти кривые, следует отметить их одинаковый характер, что может указывать на то, что удельная скорость роста определяется количеством поглощённой биомассой энергии.

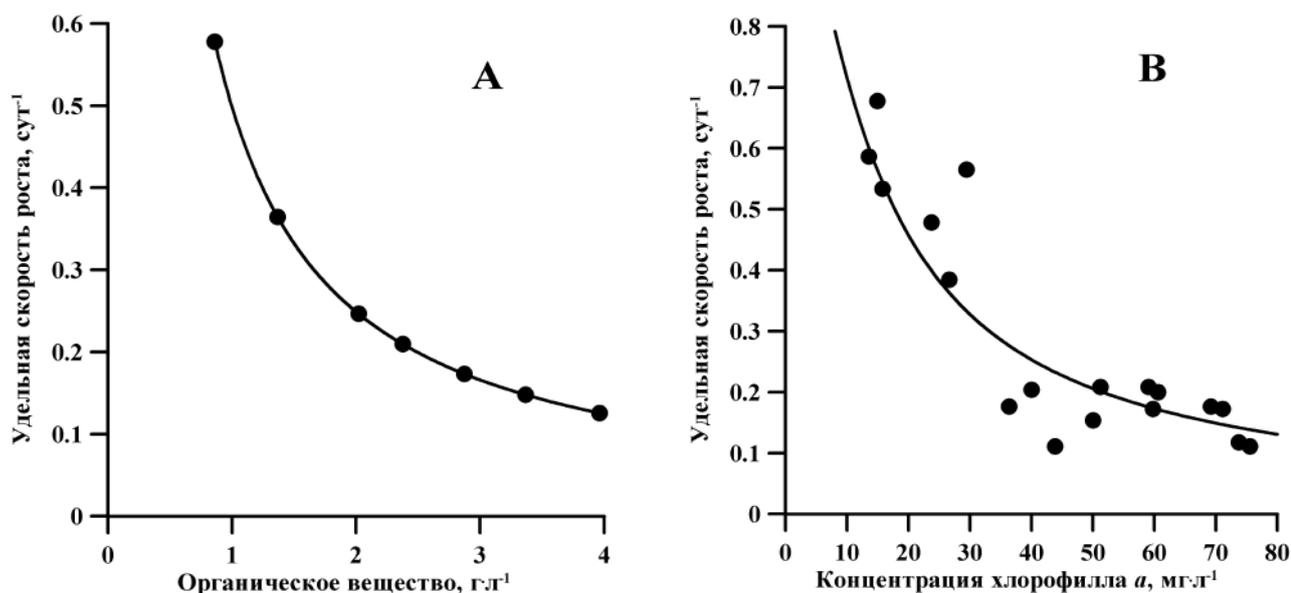


Рис. 5. А — зависимость удельной скорости роста от плотности культуры *Dunaliella salina* для линейной фазы роста. Линия — расчётная кривая. В — зависимость удельной скорости роста от концентрации хлорофилла а. Линия — расчётная кривая. Уравнения и значения коэффициентов см. в тексте

Fig. 5. А – dependence of specific growth rate on *Dunaliella salina* culture density for the linear growth phase; the line is the calculated curve. В – dependence of the specific growth rate on concentration of chlorophyll a; the line is the calculated curve. Equations and values of the coefficients are in the text of the paper

Таким образом, удельная скорость роста зависит от количества хлорофилла а, а следовательно, и от плотности культуры, что соответствует гиперболическому закону:

$$\mu = \frac{0,5}{B},$$

$$\mu = 1 \cdot \frac{1 + 0,1 \cdot C_{chla}}{1 + 0,1 \cdot C_{chla} + (0,1 \cdot C_{chla})^2}.$$

Учитывая, что концентрация хлорофилла а и биомасса взаимосвязаны, можно сделать вывод, что снижение удельной скорости роста в эксперименте, постоянство продуктивности и линейный рост биомассы определяются световыми условиями, в которых находятся клетки микроводорослей.

Заключение. В работе выявлена прямая зависимость между содержанием общего белка и хлорофилла а в культурах микроводорослей. Экспериментально показано, что удельная скорость роста определяется количеством поглощённой биомассой энергии. Предложена математическая модель, позволяющая описывать зависимость хлорофилла а при высоких оптических плотностях культур микроводорослей. Дано новое объяснение линейного роста плотности культуры микроводорослей на основе анализа поглощения световой энергии клетками. Подобное явление отмечено только в условиях выращивания микроводорослей в плоскопараллельных культиваторах.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИМБИ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021350003-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Гудвиллович И. Н., Боровков А. Б. Продукционные характеристики *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры // *Альгология*. 2014. Т. 24, № 1. С. 34–46. [Gudvilovich I. N., Borovkov A. B. Production characteristics of the microalgae *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. under batch and semicontinuous cultivation. *Algologiya*, 2014, vol. 24, no. 1, pp. 34–46. (in Russ.)].
2. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Тренкеншу Р. П., Вялова О. Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях азотного питания // *Экология моря*. 2002. Вып. 62. С. 61–66. [Minyuk G. S., Drobetskaya I. V., Trenkenshu R. P., Vyalova O. Yu. Growth and biochemical characteristics of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler under different conditions of nitrogen nutrition. *Ekologiya morya*, 2002, iss. 62, pp. 61–66. (in Russ.)].
3. Тренкеншу Р. П. *Ростовые и фотозенергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 1984. 28 с. [Trenkenshu R. P. *Rostovye i fotoenergeticheskie harakteristiki morskikh mikrovodoroslej v plotnoj kulture*: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Krasnoyarsk, 1984, 28 p. (in Russ.)].
4. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. 6. Предельные скорости роста // *Экология моря*. 2010. Вып. 80: Биотехнология водорослей. С. 85–91. [Trenkenshu R. P. The simplest models of microalgae growth. 6. Limits of growth rate. *Ekologiya morya*, 2010, iss. 80: Biotekhnologiya vodoroslej, pp. 85–91. (in Russ.)].
5. Тренкеншу Р. П., Лелеков А. С., Боровков А. Б., Новикова Т. М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей [Электронный ресурс] // *Вопросы современной альгологии*. 2017. № 1 (13). Режим доступа: <http://algology.ru/1097> (дата обращения 22.06.2017). [Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Borovkov A. B., Novikova T. M. Unified installation for microalgae laboratory studies [Electronic resource]. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2017, no. 1 (13). Available at: <http://algology.ru/1097> (accessed 22.06.2017). (in Russ.)].
6. Тренкеншу Р. П., Лелеков А. С., Гаврилов П. Е., Набойщиков В. С. Математическая модель зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2016. № 1-1. С. 77–82. [Trenkenshu R. P., Lelekov A. S., Gavrilov P. E., Nabojschikov V. S. Mathematical model dependence optical density from microalgae biomass. *Aktual'nye voprosy biologicheskoy fiziki i khimii*, 2016, no. 1-1, pp. 77–82. (in Russ.)].

7. Borovkov A. B., Gudvilovich I. N. Growth and biochemical indices of *Dunaliella salina* under conditions of batch culture. *Hydrobiological Journal*, 2013, vol. 49, no. 2, pp. 75–84.
8. Lelekov A. S., Gevorgiz R. G., Zhondareva Ya. D. Production characteristics of *Phaeodactylum tricornerutum* Bohlin grown on medium with artificial sea water. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2016, vol. 52, no. 3, pp. 331–335.
9. Naumann Th., Çebi Z., Podola B., Melkonian M. Growing microalgae as aquaculture feeds on twin-layers: a novel solid-state photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, 2013, vol. 25, pp. 1413–1420.

LINEAR GROWTH OF MARINE MICROALGAE CULTURE

R. P. Trenkenshu, A. S. Lelekov, T. M. Novikova

Kovalevsky Institute of Marine Biological Research RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: nowtanj@yandex.ru

A new explanation for linear growth microalgae culture density is proposed. Equations describing the dependence of light absorption coefficient and the specific rate of biomass synthesis on chlorophyll concentration are obtained. The specific extinction coefficient for *Tetraselmis virilis* culture ($0.008 \text{ m}^{-2} \cdot \text{mg chlorophyll a}$) is calculated.

Keywords: light absorption coefficient, specific growth rate, chlorophyll a

Тренкеншу Р. П., Лелеков А. С. Моделирование роста микроводорослей в культуре. – Белгород : ООО «КОНСТАНТА», 2017. – 152 с.



В монографии представлены результаты теоретических и экспериментальных исследований роста культур микроводорослей. Монография основана на серии статей под общим названием «Простейшие модели роста микроводорослей». Уделено внимание количественным аспектам роста микроводорослей в накопительной, квазинепрерывной и непрерывной культуре. Рассмотрены механизмы ограничения роста микроводорослей различными факторами среды. Монография представляет интерес для специалистов по исследованию роста микроводорослей, а также альгобиотехнологов. Также будет полезна студентам и аспирантам, обучающимся по биологическим и биофизическим специальностям.

Trenkenshu R. P., Lelekov A. S. Modeling growth of microalgae in culture. – Belgorod: “CONSTANTA”, 2017. – 152 p.

The monograph presents the results of theoretical and experimental studies of the microalgae growth in cultures. The monograph is based on a series of articles under the title “The simplest models of microalgae growth”. Attention is paid to quantitative aspects of the growth of microalgae to batch, quasi-continuous and continuous culture. The mechanisms limiting the microalgae growth to different environmental factors are discussed.

The monograph is of interest for specialists in the study of the microalgae growth, as well as algaetechnologists. Will also be useful to undergraduate and graduate students enrolled in biological and bio-physical disciplines.