

УДК [582.261.1:57.086.83]:519.6

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУЛЬТУРЫ
ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ
CYLINDROTHECA CLOSTERIUM (EHRENBERG) REIMANN ET LEWIN
В ДВУХСТУПЕНЧАТОМ ХЕМОСТАТЕ**

© 2023 г. Р. Г. Геворгиз¹, С. Н. Железнова¹, А. С. Малахов²

¹ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация

²Национальный исследовательский Томский политехнический университет,
Томск, Российская Федерация
E-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.10.2020; после доработки 16.01.2021;
принята к публикации 20.10.2022; опубликована онлайн 14.03.2023.

В работе рассмотрены преимущества и недостатки проточного и накопительного культивирования микроводорослей. Указаны достоинства проточного культивирования, в частности в квазинепрерывном режиме в двухступенчатом хемотрате. В качестве продуцента ценных веществ предложено использовать культуру бентосной диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, которая обладает многими полезными свойствами как биологического характера, так и технологического: 1) характеризуется достаточно высокими продукционными показателями; 2) эффективно утилизирует световую энергию, что снимает ограничения на размещение производства в регионах с малым количеством солнечных дней в году; 3) характеризуется довольно низким температурным оптимумом роста, что актуально для реализации промышленных технологий на территории Российской Федерации; 4) имеет удельную плотность клеток больше единицы, поэтому они достаточно быстро оседают на дно фотобиореактора при отсутствии перемешивания культуры, что упрощает отделение биомассы от культуральной среды и снижает её себестоимость. Цель работы — изучить продукционные характеристики квазинепрерывной культуры *C. closterium* в двухступенчатом хемотрате. Исследования проводили при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ и облучённости $150 \text{ мкмоль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$. Хемотратная установка для культивирования *C. closterium* состояла из двух стеклянных фотобиореакторов плоскопараллельного типа объёмом 3 л с рабочей толщиной 5 см и рабочей поверхностью каждого фотобиореактора $0,03 \text{ м}^2$. Культуру выращивали на питательной среде RS. Перемешивание осуществляли посредством барботажа воздухом (скорость — 1,5 л воздуха на 1 л культуры в мин). Культуру исследовали при различных скоростях протока питательной среды — 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 сут^{-1} . Рассчитаны параметры роста накопительной культуры: удельная скорость роста $\mu_n = 0,7 \text{ сут}^{-1}$; время удвоения биомассы $t_d = 0,987 \text{ сут}$. Максимальная продуктивность одно- и двухступенчатого хемотрата была отмечена при оптимальной скорости протока $0,59 \text{ сут}^{-1}$ и составила $1,348$ и $1,498 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ соответственно. Экспериментально показано, что в проточной культуре продуктивность *C. closterium* выше в 2,2 раза, чем в накопительной. На основе экспериментальных данных проведён расчёт максимальной удельной скорости роста μ_m и константы насыщения K_S при лимитировании роста *C. closterium* кремнием; значения составили $1,05 \text{ сут}^{-1}$ и $0,028 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$ соответственно. Показано, что наблюдаемая потребность в кремнии в проточной культуре ($Y_{\text{пр}} = 35 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$) ниже на 7,9 %, чем в накопительной ($Y_n = 38 \text{ мг}\cdot\text{г}^{-1}$). Отмечено, что величины μ_m , K_S и $Y_{\text{пр}}$

являются важными физиологическими характеристиками диатомовой водоросли *C. closterium* и играют ключевую роль при проектировании промышленных систем для интенсивного культивирования микроводорослей.

Ключевые слова: *Cylindrotheca closterium*, хемостат, математическая модель

Микроводоросли нашли широкое применение в современной биотехнологии [Bozarth et al., 2009]. Их биомассу и продукты жизнедеятельности используют в пищевой промышленности, сельском хозяйстве, аквакультуре [Creswell, 2010; Sathasivam et al., 2019]. Важную роль микроводоросли играют в технологиях очистки сточных вод [Abinandan et al., 2018; Wollmann et al., 2019], в реабилитации водоёмов, предотвращая цветение [Kiran et al., 2016], в утилизации CO₂ [Singh, Dhar, 2019], а также в альголизации и сидерации почв. На их основе созданы промышленные технологии получения уникальных биологически активных соединений, которые применяются в медицине и парфюмерии [Lauritano et al., 2016; Lincoln et al., 1990; Patras et al., 2018] и т. д. Микроводоросли очень активно используют в различных сферах деятельности человека, однако их потенциал далеко не исчерпан. Выделение новых объектов для интенсивного культивирования из природных популяций, а также получение генетически модифицированных штаммов с заданными свойствами постоянно расширяют возможности для создания новых биотехнологий на основе микроводорослей. В этом направлении достигнуты немалые успехи, но поиск новых продуцентов продолжается.

Известно, что многие ценные вещества микроводоросли накапливают именно в стрессовых условиях, к примеру при лимитировании роста биогенными элементами. В связи с этим разработаны различные способы двухстадийного накопительного культивирования микроводорослей, когда на первом этапе происходит накопление биомассы, а на втором — накопление ценных веществ, например липидов и каротиноидов [Lu et al., 2018; Minyuk et al., 2014; Nagappan et al., 2019]. Существенным недостатком двухстадийного накопительного культивирования является гибель немалой части клеток микроводорослей на втором этапе, при создании стрессовых условий, что значительно снижает эффективность процесса получения целевого продукта [Minyuk et al., 2014]. Наиболее перспективной альтернативой двухстадийному методу накопительной культуры является метод проточного культивирования микроводорослей, в частности использование двухступенчатого хемостата с равной или разной удельной скоростью протока для каждой ступени.

С позиции получения ценных биологически активных соединений в промышленных масштабах наиболее перспективными объектами культивирования являются бентосные виды микроводорослей, которые обладают многими полезными свойствами как биологического, так и технологического характера. Так, они: 1) характеризуются достаточно высокими продукционными показателями [Железнова, 2019]; 2) эффективно утилизируют световую энергию [Baldisserotto et al., 2019], что снимает ограничения на размещение производства в регионах с малым количеством солнечных дней в году; 3) характеризуются довольно низким температурным оптимумом роста [Salleh, McMinn, 2011; Stock et al., 2019], что актуально для реализации технологий на территории Российской Федерации; 4) имеют удельную плотность клеток больше единицы, поэтому достаточно быстро оседают на дно фотобиореактора при отсутствии перемешивания культуры, что упрощает отделение биомассы от культуральной среды, снижает её себестоимость и т. д.

В литературе данные об интенсивной культуре бентосных микроводорослей немногочисленны. Также практически отсутствуют описания исследований бентосных диатомей в проточной культуре. Среди многих видов бентосных микроводорослей для интенсивного культивирования в промышленных масштабах наибольшее внимание привлекает диатомея *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin, 1964 [Геворгиз и др., 2016;

Wang et al., 2018], которая способна накапливать ценные полиненасыщенные жирные кислоты и фукоксантин [Wang et al., 2015; Zheleznova et al., 2017], а также йод, железо и другие микроэлементы в органической форме [Железнова и др., 2015a; de la Cuesta, Manley, 2009].

Цель работы — исследовать производственные характеристики квазинепрерывной культуры *C. closterium* в двухступенчатом хемостате.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе изучали культуру диатомовой водоросли *C. closterium* из коллекции культур микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ. Полученную из этой коллекции культуру адаптировали к концентрированной питательной среде RS [Железнова и др., 2015b] и к условиям интенсивного культивирования в течение двух недель. Адаптированную культуру осадил центрифугированием (при 1600 г в течение 1 мин), затем удалили надосадочную жидкость, а сырую массу водорослей использовали в качестве инокулята для исследования производственных характеристик квазинепрерывной культуры в хемостате. В работе с хемостатом применяли питательную среду RS с увеличенной в 3 раза концентрацией каждого компонента, приготовленную на стерильной черноморской воде. Состав использованной питательной среды представлен в табл. 1.

Таблица 1. Состав питательной среды RS [Железнова и др., 2015b], используемой в эксперименте

Table 1. Composition of the nutrient medium RS [Zheleznova et al., 2015b] used in the experiment

№	Компонент	Навеска, г·л ⁻¹
1	NaNO ₃	2,331
2	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0,665
3	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	1,158
4	Na ₂ EDTA	0,792
5	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,192
6	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0006
7	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,001 32
8	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,0006
9	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,001 08
10	NaMoO ₄ · H ₂ O	0,000 36

Исследования производственных характеристик *C. closterium* проводили при оптимальных световых условиях, при оптимальной температуре и обеспеченности биогенными элементами. Хемостатная установка для культивирования *C. closterium* (рис. 1) состояла из двух стеклянных фотобиореакторов (двухступенчатый хемостат) плоскопараллельного типа; объём каждого — 3 л, рабочая толщина — 5 см. Рабочий объём суспензии в каждом фотобиореакторе поддерживали на постоянном уровне (2 л). Эксперимент проводили с равномерным круглосуточным односторонним освещением фотобиореакторов. Источником освещения служили люминесцентные лампы SE-PIL-1-LF 46W/54-765 (Польша), которые на рабочей поверхности каждого фотобиореактора (0,03 м²) давали в среднем 150 мкмоль квантов·м⁻²·с⁻¹ (33 Вт·м⁻²). Облучённость измеряли спектрофотометром «ТКА-Спектр» (ФАР). На протяжении всего эксперимента температуру суспензии водорослей поддерживали на постоянном уровне (20 ± 1) °С. Для обеспечения клеток углеродом культуру в обоих фотобиореакторах барботировали воздухом (1,5 л воздуха на 1 л культуры в мин) с помощью компрессорной установки. Для увеличения растворимости CO₂ в культуральной среде подачу воздуха в суспензию осуществляли через насадку-диспергатор.

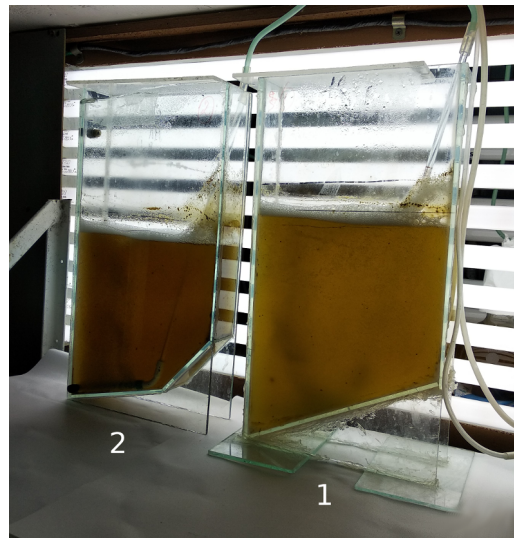


Рис. 1. Культура *Cylindrotheca closterium* в двухступенчатом хемостате (номера ступеней указаны цифрами)

Fig. 1. *Cylindrotheca closterium* culture in a two-stage chemostat (stages are indicated by numbers)

На первом этапе эксперимента культуру выращивали в накопительном режиме, на втором — в квазинепрерывном. Пропорционально-проточное квазинепрерывное культивирование *C. closterium* осуществляли в однопоточном режиме следующим образом: 1) ежедневно из второго фотобиореактора (вторая ступень хемостата) изымали часть рабочего объема на урожай; 2) из первого фотобиореактора (первая ступень хемостата) изымали такую же часть рабочего объема и переносили во второй фотобиореактор, восстанавливая таким образом рабочий объем во втором фотобиореакторе; 3) рабочий объем в первом фотобиореакторе восстанавливали, добавляя свежую питательную среду. Разбавление культуры осуществляли ежедневно.

После накопительного культивирования, с 6-го дня эксперимента, культуру выращивали в квазинепрерывном режиме со скоростью потока питательной среды через рабочий объем суспензии микроводорослей $0,6 \text{ л} \cdot \text{сут}^{-1}$ (скорость разбавления, или удельная скорость потока, $\omega = 0,6 / 2 = 0,3 \text{ сут}^{-1}$). С 17-го по 27-й день эксперимента была установлена удельная скорость потока $0,1 \text{ сут}^{-1}$; с 27-го по 35-й — $0,5 \text{ сут}^{-1}$; с 35-го по 40-й — $0,7 \text{ сут}^{-1}$; с 40-го по 44-й — $0,9 \text{ сут}^{-1}$.

Для определения плотности культуры применяли два метода — метод йодатной окисляемости [Геворгиз и др., 2015] и прямое взвешивание сырой массы *C. closterium* в полипропиленовых пробирках на аналитических весах с погрешностью $0,1 \text{ мг}$ после осаждения клеток центрифугированием (1600 g в течение 2 мин). Для пересчета полученных данных на сухую массу использовали коэффициент связи между сухой и сырой массой ($k = 0,1$) [Железнова, Геворгиз, 2020].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика плотности культуры *C. closterium* в накопительном и проточном режиме культивирования представлена на рис. 2. В эксперименте использовали адаптированную культуру, поэтому лаг-фазу у накопительной кривой не наблюдали. Экспоненциальная фаза роста длилась четверо суток. В стационарной фазе плотность культуры оставалась практически неизменной. При переходе к квазинепрерывному режиму культивирования была отмечена быстрая адаптация к условиям проточного культивирования. При изменении удельной скорости потока переходные процессы были непродолжительными (не более 2–3 суток), значение плотности культуры достаточно быстро достигало нового стационарного динамического равновесия (рис. 2).

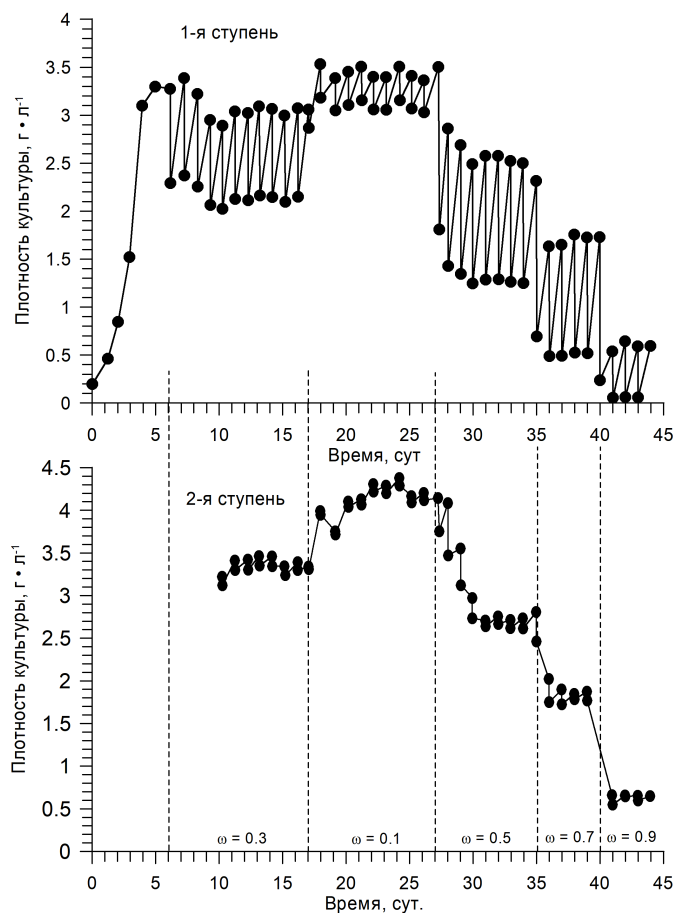


Рис. 2. Динамика плотности культуры *Cylindrotheca closterium* в накопительном режиме культивирования и в двухступенчатом хемостате при различной скорости потока питательной среды ω (границы указаны пунктиром)

Fig. 2. Dynamics of *Cylindrotheca closterium* density in the batch culture and in the two-stage chemostat at different dilution rates ω (the boundaries are indicated by the dotted lines)

И в первой, и во второй ступенях хемостата при удельной скорости потока $0,1 \text{ сут}^{-1}$ была зафиксирована незначительная агглютинация клеток, которая приводила к трудностям отбора проб при измерении плотности культуры и способствовала увеличению разброса данных. В обеих ступенях хемостата практически при любой скорости потока клетки равномерно распределялись по всему рабочему объёму. При удельной скорости потока $0,9 \text{ сут}^{-1}$ регистрировали пристеночный рост культуры, и барботажа воздухом для перемешивания суспензии было недостаточно. Даже после перемешивания культуры ручной мешалкой часть биомассы довольно быстро оседала на дно или стенки фотобиореактора.

Параметры роста. В начале накопительного культивирования при внесении инокулята в питательную среду плотность культуры (B_0) составила $0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Лаг-фазы у накопительной культуры не было, поскольку к условиям эксперимента её адаптировали ранее. Экспоненциальная фаза накопительной кривой характеризовалась постоянной удельной скоростью роста и с высокой точностью ($R^2 = 0,99$) описывалась уравнением (1) (рис. 3):

$$\ln B = \mu_n (t - t_0) + \ln B_0; \quad \ln B = 0,7 t - 1,61, \quad (1)$$

где μ_n — удельная скорость роста в накопительной культуре, сут^{-1} ;

B_0 — плотность культуры в начальный момент времени t_0 ($t_0 = 0$).

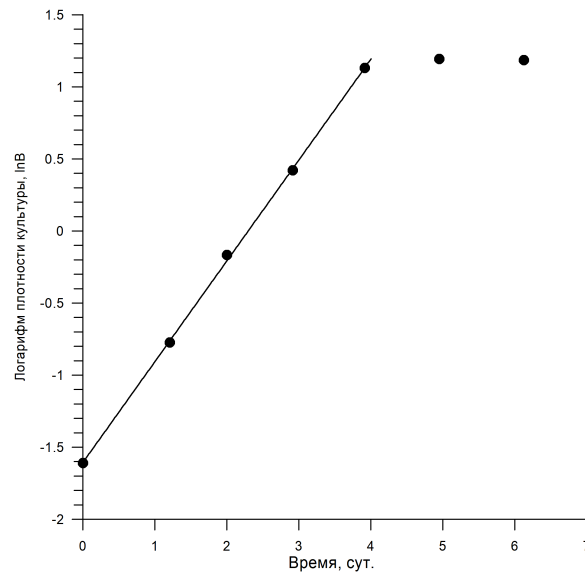


Рис. 3. Динамика плотности культуры *Cyindrotheca closterium* в накопительном режиме культивирования в полулогарифмических координатах. Аппроксимация экспериментальных точек уравнением (1), $R^2 = 0,99$. Удельная скорость роста $\mu_H = 0,7 \text{ сут}^{-1}$

Fig. 3. Dynamics of *Cyindrotheca closterium* density in the batch culture in semi-logarithmic coordinates. Approximation of experimental points by equation (1), $R^2 = 0.99$. The specific growth rate $\mu_H = 0.7 \text{ day}^{-1}$

Время удвоения биомассы в экспоненциальной фазе роста (t_d) составило:

$$t_d = \ln 2 \frac{t - t_0}{\ln B - \ln B_0} = \frac{\ln 2}{\mu_H} = \frac{0,693}{0,7} = 0,987. \quad (2)$$

Обратное время удвоения (рис. 3):

$$\log_2 B = \frac{1}{t_d}(t - t_0) + \log_2 B_0, \quad \frac{1}{t_d} = \frac{\mu_H}{\ln 2} = \frac{0,7}{0,693} = 1,01. \quad (3)$$

На 5-й день эксперимента культура достигла стационарной фазы роста. В этой фазе плотность культуры оставалась неизменной ($B_m = 3,3 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) до момента перехода к квазинепрерывному режиму культивирования (рис. 2). За 5 дней накопительного культивирования урожай составил $B_H(5) = B_m - B_0 = 3,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, то есть средняя продуктивность накопительной культуры $\bar{P}_H = 0,62 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

Количественные потребности в биогенных элементах активно растущей культуры *C. closterium* экспериментально определены нами ранее [Железнова и др., 2015b]. На основе этих данных по формуле (4) рассчитаны экономические коэффициенты ($Y_{\text{ЭК}}$) для некоторых биогенных элементов (табл. 2):

$$Y_{\text{ЭК}} = \frac{1}{Y_H}, \quad (4)$$

где Y_H — наблюдаемая потребность в биогенном элементе в накопительной культуре.

Для нахождения зависимости удельной скорости роста *C. closterium* от концентрации лимитирующего субстрата в питательной среде по данным из [Железнова, Геворгиз, 2014] рассчитывали константу насыщения (K_S). Проанализировав состав и соотношения биогенных элементов в питательной среде F [Guillard, 1975; Guillard, Ryther, 1962], а также соотношения потребностей

для *C. closterium* из табл. 2, можно утверждать, что при культивировании *C. closterium* на питательной среде F, как это сделано в работе [Железнова, Геворгиз, 2014], лимитирующим рост фактором является концентрация в ней кремния, поэтому константу насыщения рассчитывали именно для кремния (рис. 4):

$$P = P_m \frac{S}{K_S + S}, \quad P = 1,81 \frac{S}{0,028 + S}; \quad \mu = \mu_m \frac{S}{K_S + S}, \quad \mu = \mu_m \frac{S}{0,028 + S}, \quad (5)$$

где S — концентрация лимитирующего субстрата (кремния) в питательной среде, г·л⁻¹.

Таблица 2. Наблюдаемые потребности для *Cylindrotheca closterium* в накопительной культуре (Y_H) по данным из [Железнова, Геворгиз, 2014] и расчётные значения экономических коэффициентов ($Y_{ЭК}$) по формуле (4) для некоторых биогенных элементов

Table 2. Observed requirements for *Cylindrotheca closterium* in the batch culture (Y_H) according to the data from [Zheleznova, Gevorgiz, 2014] and calculated values of economic coefficients ($Y_{ЭК}$) according to formula (4) for some nutrients

№	Биогенный элемент	Y_H , мг·г ⁻¹	$Y_{ЭК}$, г·г ⁻¹
1	Азот	64 ± 1	15,6
2	Кремний	38,2 ± 0,01	26,2
3	Фосфор	17 ± 1	60,3
4	Железо	45 ± 0,2	22,2

Проточная культура. Теория хемостата разработана для непрерывных культур гетеротрофных микроорганизмов во второй половине XX в. и детально изложена в работах [Непрерывное культивирование микроорганизмов, 1968; Перт, 1978; Herbert et al., 1956; Maxon, 1955; Methods in Microbiology, 1970]. В ряде случаев она применима и для низших фототрофов. Но в связи с тем, что для их роста необходима световая энергия, которая наравне с биогенными элементами может лимитировать рост клеток, для фототрофов теория хемостата требует поправок и уточнений. Особенно это актуально для плотных культур микроводорослей, когда накопительная кривая характеризуется наличием не только экспоненциальной фазы роста, но и продолжительной фазы замедления роста (фазы отрицательного ускорения роста). Особо следует отметить необходимость существенных дополнений и изменений в теории хемостата в таких случаях, когда: 1) используется естественное освещение, когда в течение суток наблюдается смена лимитирующего рост фактора; 2) организация непрерывного протока питательной среды затруднительна или нецелесообразна и пр. В таком случае на практике часто применяют культуру с периодическим разбавлением (квазинепрерывную культуру). Стоит подчеркнуть, что метод квазинепрерывного культивирования является некоторым обобщением различных способов проточного культивирования микроорганизмов, однако публикации, посвящённые моделированию процессов в квазинепрерывной культуре, достаточно редки [Тренкеншу, 2005; Фенцл, 1968].

В нашем эксперименте экспоненциальную фазу роста накопительной кривой с высокой точностью описывало уравнение для экспоненциального роста (см. уравнение (1) и рис. 3), то есть рост клеток практически не ограничивался световыми условиями, поэтому можно считать, что смена лимитирующего фактора на этом участке не происходила. Это обстоятельство позволяет для вывода уравнений динамики плотности квазинепрерывной культуры применять подход, аналогичный тому, который был использован при работе с гетеротрофными микроорганизмами. Рассмотрим квазинепрерывную культуру в пропорционально-проточном однопоточном многоступенчатом хемостате с одинаковым рабочим объёмом V (л) в каждой ступени и с неизменным

объёмом w (л), который удаляется из каждой ступени при процедуре обмена. Отношение массы водорослей в i -й ступени хемостата m_i (г) к рабочему объёму V (л) определяет текущую плотность культуры в данной ступени ($\text{г}\cdot\text{л}^{-1}$):

$$B_i = \frac{m_i}{V}. \quad (6)$$

В результате процедуры обмена из i -й ступени хемостата удаляется объём w , в котором содержится масса водорослей m_i^* . В оставшемся объёме $(V - w)$ содержится масса водорослей m_i^{**} . Следовательно, можно записать такие равенства:

$$m_i = m_i^* + m_i^{**}; \quad m_i^* = w \cdot B_i; \quad m_i^{**} = V \cdot B_i - w \cdot B_i = (V - w) \cdot B_i. \quad (7)$$

В многоступенчатом хемостате после удаления объёма w в i -ю ступень поступает такой же объём суспензии из предыдущей ступени, поэтому плотность культуры в i -й ступени после обмена ($B_i^{(-)}$) будет равна:

$$B_i^{(-)} = \frac{m_{i-1}^* + m_i^{**}}{V} = \frac{w \cdot B_{i-1} + (V - w) \cdot B_i}{V}, \quad (8)$$

где m_{i-1}^* — масса водорослей из предыдущей ступени, которая вносится в текущую ступень при процедуре обмена;

B_{i-1} — плотность культуры в предыдущей ступени хемостата.

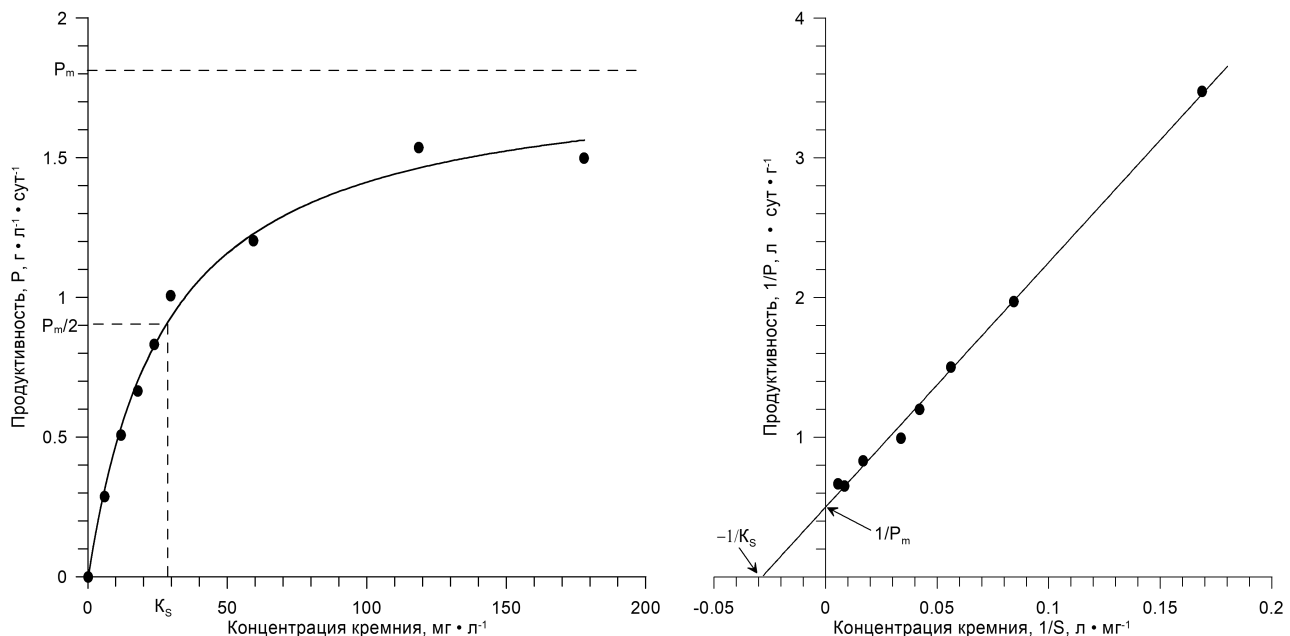


Рис. 4. Зависимость скорости роста культуры *Cylindrotheca closterium* от концентрации кремния в питательной среде. $P_m = 1,81 \text{ г}\cdot(\text{л}\cdot\text{сут})^{-1}$; $K_S = 0,028 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$. Расчёт по уравнению (5) по экспериментальным данным из [Железнова, Геворгиз, 2014]

Fig. 4. Dependence of *Cylindrotheca closterium* growth rate on the silicon concentration in the nutrient medium. $P_m = 1.81 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{day})^{-1}$; $K_S = 0.028 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Calculation by equation (5) according to the experimental data from [Zheleznova, Gevorgiz, 2014]

Из этого следует:

$$\frac{w}{V} = \frac{B_i - B_i^{(-)}}{B_i - B_{i-1}} = \frac{m_i^* - m_{i-1}^*}{m_i - m_{i-1}}, \quad (9)$$

то есть доля объёма при процедуре обмена равна отношению массы водорослей, удаляемой при обмене из текущей ступени, к разнице масс водорослей в текущей и предыдущей ступенях хемостата.

Отношение плотности культуры до и после процедуры обмена указывает на величину разбавления культуры (θ_i) — на то, во сколько раз уменьшаются масса водорослей и плотность культуры в i -й ступени:

$$\theta_i = \frac{B_i}{B_i^{(-)}} = \frac{V}{V - w \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}\right)}. \quad (10)$$

Заметим, что если культуру разбавляют питательной средой ($B_{i-1} = 0$), то получается выражение для первой ступени хемостата, аналогичное выражению в работе [Тренкеншу, 2005]:

$$\theta_1 = \frac{B_1}{B_1^{(-)}} = \frac{V}{V - w}.$$

Из выражений (9) и (10) следует:

$$\frac{w}{V} = \frac{B_i - B_i^{(-)}}{B_i - B_{i-1}} = \frac{B_i - \frac{1}{\theta_i} B_i}{B_i - B_{i-1}}. \quad (11)$$

В квазинепрерывной культуре изменение массы водорослей (Δm_i) определяется двумя процессами — увеличением массы водорослей за счёт их роста и уменьшением массы за счёт разницы притока и оттока с частью суспензии при процедуре обмена:

$$\underbrace{m_{i+1} - (m_{i-1}^* + m_i^{**})}_{\text{прирост}} + \underbrace{m_{i-1}^*}_{\text{приток}} - \underbrace{(m_i - m_i^{**})}_{\text{убыль с оттоком}} = m_{i+1} - m_i = \Delta m_i, \quad (12)$$

где m_i — масса водорослей до обмена;

m_{i+1} — масса водорослей до обмена на следующем шаге квазинепрерывного культивирования;

m_{i-1}^* — масса водорослей, вносимых в i -ю ступень из предыдущей ступени при процедуре обмена;

m_i^{**} — масса водорослей, которая остаётся в i -й ступени после удаления части суспензии объёмом w .

Учитывая (6), (7) и (8), запишем изменение плотности культуры (ΔB_i):

$$\underbrace{[B_{i+1} - B_i^{(-)}]}_{\text{прибыль}} - \underbrace{[B_i - B_i^{(-)}]}_{\text{убыль}} = B_{i+1} - B_i = \Delta B_i, \quad (13)$$

где B_i — плотность культуры до обмена (текущая плотность);

$B_i^{(-)}$ — плотность культуры после процедуры обмена;

B_{i+1} — плотность культуры до обмена на следующем шаге квазинепрерывного культивирования.

В микробиологической практике рост водорослей в культуре выражается двумя количественными характеристиками — скоростью роста (продуктивностью) и относительной (удельной) скоростью роста. За промежуток времени между процедурами обмена Δt (сут) плотность культуры в i -й ступени возрастет до величины B_{i+1} , поэтому на данном промежутке времени средняя скорость роста составит ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$):

$$\bar{P}_i = \frac{B_{i+1} - B_i^{(-)}}{\Delta t}, \quad (14)$$

а средняя относительная скорость роста составит (сут^{-1}):

$$\bar{\mu}_i = \frac{B_{i+1} - B_i^{(-)}}{B_i^{(-)} \cdot \Delta t}. \quad (15)$$

Убыль плотности определяется величиной разбавления культуры, которая зависит от массы водорослей, выносимой из текущей ступени хемостата при процедуре обмена, и массы водорослей, вносимой в рабочий объем из предыдущей ступени хемостата. Из рабочего объема за одну процедуру обмена в течение промежутка времени Δt удаляется объем w , поэтому скорость протока культуры (F) в текущей ступени хемостата равна ($\text{л} \cdot \text{сут}^{-1}$):

$$F = \frac{w}{\Delta t},$$

а относительная (удельная) скорость протока ω равна (сут^{-1}):

$$\omega = \frac{F}{V} = \frac{w}{V \cdot \Delta t}. \quad (16)$$

С учётом (10) и (16) можно выразить величину удельной скорости протока питательной среды для i -й ступени следующим образом:

$$\omega \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}\right) = \left(1 - \frac{1}{\theta_i}\right) \frac{1}{\Delta t}; \quad \omega = \frac{1 - \frac{1}{\theta_i}}{1 - \frac{B_{i-1}}{B_i}} \frac{1}{\Delta t}. \quad (17)$$

Отметим: (16) позволяет рассчитать для i -й ступени удельную скорость протока суспензии водорослей (или питательной среды для первой ступени), которая во всех ступенях хемостата одинакова. Выражение (17) указывает на то, какова будет удельная скорость протока при уменьшении плотности культуры в i -й ступени в θ_i раз с учётом плотности культуры в предыдущей ступени хемостата.

Величину изменения плотности культуры (13) за промежуток времени Δt можно выразить через скорость роста и скорость протока. Из (11), (13) и (16) следует:

$$\frac{\Delta B_i}{\Delta t} = \frac{B_{i+1} - B_i^{(-)}}{\Delta t} - \frac{B_i - B_i^{(-)}}{\Delta t} = \bar{P}_i - \omega (B_i - B_{i-1}). \quad (18)$$

Таким образом, скорость изменения плотности квазинепрерывной культуры в текущей ступени хемостата определяется средней скоростью роста (\bar{P}_i), скоростью внесения водорослей из предыдущей ступени ($\omega \cdot B_{i-1}$), а также скоростью удаления водорослей при обмене ($\omega \cdot B_i$).

Выразим среднюю скорость роста \bar{P}_i в единицах плотности культуры (биомассы) в i -й ступени хемостата:

$$\bar{P}_i = \tilde{\mu}_i \cdot B_i, \quad (19)$$

где $\tilde{\mu}_i$ — коэффициент, отражающий долю прироста биомассы B_i за промежуток времени Δt .

По сути этот коэффициент является относительной скоростью роста, аналогичной (15), с той лишь разницей, что скорость прироста относится не к плотности культуры после обмена, а к плотности культуры до обмена — к B_i . Из сравнения (14), (19) и (10) ясно, что $\bar{\mu}_i = \tilde{\mu}_i \cdot \theta_i$, и отличие между этими величинами будет тем меньше, чем ближе θ_i к единице и чем меньше интервал времени Δt между разбавлениями культуры.

Подставляя (19) в (18), получаем следующее уравнение:

$$\frac{\Delta B_i}{\Delta t} = \tilde{\mu}_i \cdot B_i - \omega (B_i - B_{i-1}) = \left[\tilde{\mu}_i - \omega \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i} \right) \right] B_i. \quad (20)$$

Таким образом, получено уравнение, решение которого позволяет описать динамику плотности квазинепрерывной культуры в многоступенчатом хемостате. В частном случае, при $\Delta t \rightarrow 0$, $\tilde{\mu}_i \rightarrow \mu_i$, $\theta_i \rightarrow 1$ (непрерывный проток), получаем дифференциальные уравнения, которые идентичны уравнениям, опубликованным в работах [Перт, 1978; Фенцл, 1968].

Для первой ступени хемостата, когда культуру разбавляют питательной средой ($B_{i-1} = 0$), выражение (20) преобразуется в:

$$\frac{\Delta B_1}{\Delta t} = \tilde{\mu}_1 \cdot B_1 - \omega \cdot B_1 = (\tilde{\mu}_1 - \omega) B_1. \quad (21)$$

Оно полностью идентично выражению, полученному ранее для квазинепрерывной культуры в одноступенчатом хемостате [Тренкеншу, 2005].

Поскольку в нашем эксперименте переходные процессы при различных изменениях скорости протока питательной среды были кратковременны (рис. 2), мы станем рассматривать только установившиеся процессы (стационарное динамическое равновесие), то есть такие, при которых плотность культуры с течением времени в каждой ступени хемостата остаётся неизменной ($\Delta B_i = 0$). Для условий стационарного динамического равновесия из (20) следуют выражения для относительной скорости роста и продуктивности культуры в i -й ступени хемостата:

$$\tilde{\mu}_i = \omega \left(1 - \frac{B_{i-1}}{B_i} \right); \quad \bar{P}_i = \omega (B_i - B_{i-1}). \quad (22)$$

Отсюда следуют связь плотностей культуры в соседних ступенях хемостата, а также скорость разбавления в i -й ступени:

$$B_i = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_i} B_{i-1}; \quad \omega = \tilde{\mu}_i \frac{B_i}{B_i - B_{i-1}} = \frac{\bar{P}_i}{B_i - B_{i-1}}. \quad (23)$$

Заметим, что для условий стационарного динамического равновесия будут справедливы равенства:

$$B_i = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_i} B_{i-1} = q_i \cdot B_{i-1}; \quad \tilde{\mu}_i = \omega \left(1 - \frac{1}{q_i} \right) = \omega \cdot \epsilon_i; \quad \tilde{\mu}_i = \frac{\epsilon_i}{\epsilon_{i-1}} \tilde{\mu}_{i-1}, \quad (24)$$

где q_i , ϵ_i и ϵ_{i-1} — некоторые постоянные величины, легко определяемые экспериментальным путём.

Действительно, экспериментально полученный нами коэффициент связи между плотностью культуры в первой и второй ступенях хемостата q_2 постоянен для любой скорости протока (рис. 5). Из рисунка видно, что даже при максимальной скорости протока, когда зарегистрирован пристеночный рост, связь между плотностью культуры в первой и второй ступенях достаточно хорошо описывается выражением (23) при $q_2 = \operatorname{tg}\alpha = 1,11$.

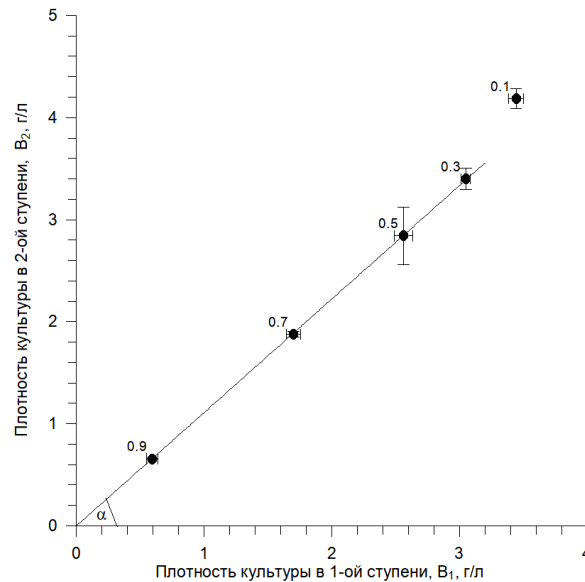


Рис. 5. Связь между плотностью культуры в первой и второй ступенях хемостата в условиях стационарного динамического равновесия, $\operatorname{tg}\alpha = 1,11$ [см. выражение (23)]. Удельная скорость протока, ω , указана цифрами. Значение для $\omega = 0,1$ в расчётах не учитывали из-за проявления агглютинации клеток

Fig. 5. The relationship between culture density in the first and second chemostat stages under conditions of stationary dynamic equilibration, $\operatorname{tg}\alpha = 1.11$ [see expression (23)]. The dilution rate, ω , is indicated by numbers. The value for $\omega = 0.1$ was not taken into account in the calculations due to the manifestation of cell agglutination

Выражение для продуктивности культуры в i -й ступени (22) можно представить в виде:

$$B_i = \frac{\bar{P}_i}{\omega} + B_{i-1}. \quad (25)$$

У культуры в стационарном динамическом равновесии всегда $\bar{P}_i > 0$ и $\omega > 0$, поэтому для любого режима квазинепрерывного культивирования в многоступенчатом хемостате $B_i > B_{i-1}$. Если культуру разбавляют питательной средой ($B_{i-1} = 0$), то из выражения (22) следует:

$$\tilde{\mu}_1 = \omega; \quad \bar{P}_1 = \omega \cdot B_1. \quad (26)$$

Для нахождения зависимости концентрации лимитирующего рост биогенного элемента в текущей ступени хемостата от скоростей протока и потребления субстрата клетками в процессе роста будем придерживаться логики вывода уравнения (20). По аналогии с (7) можно записать следующие выражения:

$$s_i = s_i^* + s_i^{**}; \quad s_i^* = w \cdot S_i; \quad s_i^{**} = V \cdot S_i - w \cdot S_i = (V - w) \cdot S_i, \quad (27)$$

где s_i — масса лимитирующего субстрата в рабочем объёме i -й ступени хемостата, г;

s_i^* и s_i^{**} — масса лимитирующего субстрата в удаляемом объёме w при обмене и в оставшемся объёме $(V - w)$ соответственно;

S_i — концентрация лимитирующего субстрата в i -й ступени хемостата, г·л⁻¹.

Концентрация лимитирующего субстрата в i -й ступени после обмена ($S_i^{(-)}$) будет равна:

$$S_i^{(-)} = \frac{s_{i-1}^* + s_i^{**}}{V} = \frac{w \cdot S_{i-1} + (V - w) \cdot S_i}{V}. \quad (28)$$

Из этого выражения следует:

$$\frac{w}{V} = \frac{S_i^{(-)} - S_i}{S_{i-1} - S_i} = \frac{s_{i-1}^* - s_i^*}{s_{i-1} - s_i}. \quad (29)$$

Изменение массы лимитирующего субстрата (Δs_i) можно выразить таким образом:

$$\underbrace{s_{i-1}^*}_{\text{приток}} - \underbrace{(s_i - s_i^{**})}_{\text{убыль с оттоком}} - \underbrace{((s_{i-1}^* + s_i^{**}) - s_{i+1})}_{\text{убыль за счёт роста}} = s_{i+1} - s_i = \Delta s_i, \quad (30)$$

где s_i — масса лимитирующего субстрата до обмена;

s_{i+1} — масса лимитирующего субстрата до обмена на следующем шаге квазинепрерывного культивирования;

s_{i-1}^* — масса субстрата, вносимая в i -ю ступень из предыдущей ступени при процедуре обмена;

s_{i-1}^{**} — масса субстрата, которая остаётся в i -й ступени после удаления части суспензии объёмом w .

Учитывая (27), (29) и (30), запишем изменение концентрации субстрата в i -й ступени хемостата (ΔS_i):

$$\underbrace{[S_i^{(-)} - S_i]}_{\text{прибыль}} - \underbrace{[S_i^{(-)} - S_{i+1}]}_{\text{убыль}} = S_{i+1} - S_i = \Delta S_i, \quad (31)$$

где S_i — концентрация субстрата до обмена;

$S_i^{(-)}$ — концентрация субстрата после процедуры обмена;

S_{i+1} — концентрация субстрата до обмена на следующем шаге квазинепрерывного культивирования.

Величину изменения концентрации субстрата (31) на промежутке времени Δt можно выразить через скорость потребления субстрата и скорость протока. Из (29), (31) и (16) следует:

$$\frac{\Delta S_i}{\Delta t} = \frac{S_i^{(-)} - S_i}{\Delta t} - \frac{S_i^{(-)} - S_{i+1}}{\Delta t} = \omega (S_{i-1} - S_i) - \bar{P}_{S_i}, \quad (32)$$

где \bar{P}_{S_i} — средняя скорость потребления лимитирующего субстрата клетками на промежутке времени Δt .

Доля кремния в биомассе *C. closterium* при разных условиях культивирования изменяется незначительно, поэтому можно предположить, что для любой скорости потока величина Y_H постоянна. В таком случае скорость потребления субстрата \bar{P}_{S_i} будет пропорциональна скорости роста \bar{P}_i микроводорослей. Следовательно, с учётом (19) выражение (32) представляется в виде:

$$\frac{\Delta S_i}{\Delta t} = \omega (S_{i-1} - S_i) - Y_H \cdot \tilde{\mu}_i \cdot B_i. \quad (33)$$

Решение данного уравнения позволит описать динамику концентрации лимитирующего рост субстрата квазинепрерывной культуры в многоступенчатом хемостате. Для частного случая (при непрерывном потоке питательной среды) это уравнение приведено в работах [Перт, 1978; Фенцл, 1968].

Для условий стационарного динамического равновесия из (33) можно выразить B_i :

$$B_i = \frac{\omega (S_{i-1} - S_i)}{\tilde{\mu}_i Y_H}; \quad \tilde{\mu}_i = \frac{\omega (S_{i-1} - S_i)}{B_i Y_H} = \omega \left(\frac{S_{i-1}}{S_i} - 1 \right). \quad (34)$$

Из (5) найдём $S_i(\tilde{\mu}_i)$:

$$S_i(\tilde{\mu}_i) = \frac{K_S \cdot \tilde{\mu}_i}{\mu_m - \tilde{\mu}_i}. \quad (35)$$

Затем (24) и (35) подставим в (34):

$$B_i = \frac{\omega}{\tilde{\mu}_i Y_H} \left(S_{i-1} - \frac{K_S \cdot \tilde{\mu}_i}{\mu_m - \tilde{\mu}_i} \right) = \frac{\omega}{\omega \cdot \epsilon_i Y_H} \left(S_{i-1} - \frac{K_S \cdot \omega \cdot \epsilon_i}{\mu_m - \omega \cdot \epsilon_i} \right). \quad (36)$$

Отсюда получим зависимость плотности культуры в i -й степени от скорости разбавления:

$$B_i(\omega) = \frac{1}{\epsilon_i Y_H} \left(S_{i-1} - \frac{K_S \cdot \omega}{\frac{1}{\epsilon_i} \mu_m - \omega} \right). \quad (37)$$

В частном случае, для первой степени хемостата, когда культуру разбавляют питательной средой ($S_{i-1} = S_0$; $\epsilon_i = 1$), с учётом (26) запишем:

$$B_1(\omega) = \frac{1}{Y_H} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (38)$$

Подставляя в последнее выражение численные значения наблюдаемой потребности в кремнии из табл. 2, константы насыщения из (5) и концентрации кремния в питательной среде RS $S_0 = 0,115 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, методом наименьших квадратов по экспериментальным данным определим μ_m . На рис. 6 показано соответствие экспериментальных данных и теоретической кривой (38) с рассчитанным значением $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$ ($R^2 = 0,97$). При расчёте значение плотности культуры при $\omega = 0,9 \text{ сут}^{-1}$ не учитывали. Как было сказано выше, при данной скорости потока регистрировали пристеночный рост *C. closterium*.

Подставляем значение $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$ в (38) и получаем для условий нашего эксперимента зависимость плотности культуры в первой степени хемостата от удельной скорости потока:

$$B_1(\omega) = \frac{1}{0,035} \left(0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right). \quad (39)$$

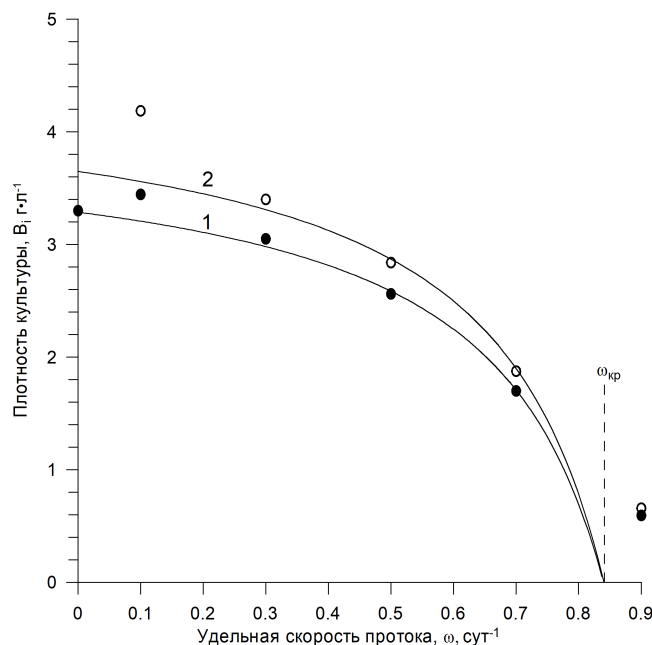


Рис. 6. Зависимость плотности культуры от удельной скорости протока ω в условиях стационарного динамического равновесия: 1 — первая ступень хемостата, расчёт по уравнению (38) ($R^2 = 0,97$); 2 — вторая ступень, расчёт по уравнению (45) ($R^2 = 0,96$). В расчётах значение для $\omega = 0,9 \text{ сут}^{-1}$ не учитывали (объяснение см. в тексте). Пунктиром указана критическая скорость разбавления $\omega_{кр} = 0,84 \text{ сут}^{-1}$

Fig. 6. The dependence of culture density on the dilution rate ω under conditions of stationary dynamic equilibrium: 1, the first stage of the chemostat, calculation according to equation (38) ($R^2 = 0.97$); 2, the second stage, calculation according to equation (45) ($R^2 = 0.96$). In the calculations, the value for $\omega = 0.9 \text{ day}^{-1}$ was not taken into account (see text for an explanation). The dotted line denotes the critical dilution rate $\omega_{кр} = 0.84 \text{ day}^{-1}$

Отметим следующее. В табл. 2 указано значение наблюдаемой потребности в кремнии $Y_H = 38,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$, однако, по результатам наших расчётов, в проточной культуре величина наблюдаемой потребности $Y_{пр} = 35,0 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$. Объяснить занижение можно проявлением процессов автоселекции у микроорганизмов в проточной культуре [Гительзон и др., 1973]. Соответственно, для накопительной культуры потребность в кремнии $Y_H = 38,2 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$, а для проточной культуры $Y_{пр} = 35,0 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$.

Анализируя выражение (38), можно заметить, что при некоторой критической скорости разбавления $\omega_{кр}$ значение B_1 обращается в нуль (рис. 6). В нашем эксперименте критическая скорость разбавления (см. рис. 6) составила:

$$\omega_{кр}(B_1) = \mu_m \frac{S_0 - Y_{пр} \cdot B_1}{S_0 + K_S - Y_{пр} \cdot B_1}; \quad \omega_{кр}(0) = \mu_m \frac{S_0}{S_0 + K_S} = \frac{1,05 \cdot 0,115}{0,115 + 0,028} = 0,84 \text{ сут}^{-1}.$$

Следовательно, с учётом (26) для условий нашего эксперимента предельное значение $\tilde{\mu}_1 = 0,84 \text{ сут}^{-1}$. В сравнении с удельной скоростью роста $\mu_H = 0,7 \text{ сут}^{-1}$, полученной в накопительной культуре [см. (1)], это значение несколько выше, что связано с процессами автоселекции в проточной культуре [Гительзон и др., 1973].

Таким образом, для условий нашего эксперимента в накопительной культуре удельная скорость роста $\mu_H = 0,7 \text{ сут}^{-1}$, её предельное значение в проточной культуре $\tilde{\mu}_1 = 0,84 \text{ сут}^{-1}$, а её максимально возможное значение при лимитировании роста *C. closterium* кремнием $\mu_m = 1,05 \text{ сут}^{-1}$.

Заметим, что максимальное значение μ_m входит в выражение (5) и представляет собой некоторую видоспецифическую характеристику субстратзависимого роста *C. closterium* (определяемую генетикой вида) при лимитировании роста кремнием.

Получить зависимость $B_2(\omega)$ для второй ступени хемостата из (37) в явном виде нельзя (как это возможно для первой ступени), так как $\epsilon_2 \neq 1$. Для получения зависимости $B_2(\omega)$ воспользуемся связью (23). Если подставить (23) в (38), получится зависимость плотности культуры во второй ступени от ω и μ_2 :

$$B_2(\omega, \mu_2) = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_2} \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (40)$$

Поскольку угол наклона q_i у линейной зависимости (24) постоянен и легко может быть найден из экспериментальных данных, для второй ступени хемостата можно записать:

$$B_2(\omega) = \frac{q_2}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (41)$$

Аналогично для i -й ступени ($i \geq 2$):

$$B_i(\omega, \mu_2, \dots, \mu_i) = \frac{\omega^{i-1}}{\prod_{k=2}^i (\omega - \tilde{\mu}_k)} \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (42)$$

Если q_i — постоянная величина для любой пары соседних ступеней, то и произведение $q_2 \cdot q_3 \cdot \dots \cdot q_i$ будет величиной постоянной. Следовательно:

$$B_i(\omega) = \frac{\prod_{k=2}^i q_k}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (43)$$

По данным нашего эксперимента (рис. 5), угол наклона у зависимости B_2 от B_1 равен:

$$q_2 = \frac{\omega}{\omega - \tilde{\mu}_2} = \text{tg } \alpha = 1,11. \quad (44)$$

Поэтому для условий нашего эксперимента зависимость плотности культуры во второй ступени хемостата от скорости разбавления можно представить следующим образом:

$$B_2(\omega) = 1,11 \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right) = \frac{1,11}{0,035} \left(0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right). \quad (45)$$

На рис. 6 показаны зависимость плотности культуры во второй ступени хемостата от удельной скорости протока и соответствие экспериментальных данных и теоретической кривой (45).

Найдём величину урожая при различных режимах культивирования. Для этого подсчитаем суммарную продуктивность культуры в i ступенях хемостата в условиях стационарного динамического равновесия. Из выражения для продуктивности i -й ступени (22) ясно, что суммарная продуктивность всех ступеней хемостата R_i (всей системы культивирования) равна:

$$R_i = \sum_{k=1}^i \bar{P}_k = \omega \cdot B_i. \quad (46)$$

Следовательно, урожай (H_i) системы культивирования, состоящей из i ступеней, в условиях стационарного динамического равновесия за некоторое фиксированное время составит ($\Gamma \cdot \text{л}^{-1}$):

$$H_i(t) = R_i \cdot t = \omega \cdot B_i \cdot t, \quad (47)$$

где t — время культивирования, сут.

Для нахождения продуктивности многоступенчатого хемостата подставим выражение (43) в (46):

$$R_i(\omega) = \omega \frac{\prod_{k=2}^i q_k}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (48)$$

Для частного случая, $R_1(\omega)$ и $R_2(\omega)$, имеем:

$$R_1(\omega) = \omega \frac{1}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right); \quad R_2(\omega) = \omega \frac{q_2}{Y_{\text{пр}}} \left(S_0 - \frac{K_S \cdot \omega}{\mu_m - \omega} \right). \quad (49)$$

Аналогичное выражение для одноступенчатого хемостата было получено в [Перт, 1978].

Подставляя экспериментальные значения и $q_2 = 1,11$ [см. (44)] в (49), имеем:

$$R_1(\omega) = \omega \frac{1}{0,035} \left(0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right); \quad R_2(\omega) = \omega \frac{1,11}{0,035} \left(0,115 - \frac{0,028 \cdot \omega}{1,05 - \omega} \right). \quad (50)$$

Таким образом, получены зависимости продуктивности одно- и двухступенчатого хемостата от удельной скорости протока. На рис. 7 представлено соответствие экспериментальных данных и теоретических кривых (50).

Найдём оптимальное значение удельной скорости протока ω_{opt} , при котором продуктивность многоступенчатого хемостата максимальна. Для этого продифференцируем функцию (48) по ω :

$$R'_i(\omega) = \frac{\prod_{k=2}^i q_k}{Y_{\text{пр}}} \frac{(K_S + S_0)\omega^2 - 2\mu_m\omega(K_S + S_0) + \mu_m^2 S_0}{(\mu_m - \omega)^2}. \quad (51)$$

При $R'_i(\omega) = 0$ получаем квадратное уравнение:

$$\omega^2 - 2\mu_m\omega + \frac{\mu_m^2 S_0}{K_S + S_0} = 0. \quad (52)$$

Один из корней этого уравнения не имеет смысла, так как должно выполняться условие $\mu_m > \omega$; второй корень — оптимальное значение удельной скорости протока, при котором достигается максимальная продуктивность всей многоступенчатой системы культивирования:

$$\omega_{opt} = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K_S}{S_0 + K_S}} \right). \quad (53)$$

Отметим, что в последнем выражении величина ω_{opt} не зависит от числа ступеней, поэтому (53) можно использовать для расчёта оптимальной удельной скорости протока как для одноступенчатого хемостата, так и для многоступенчатого.

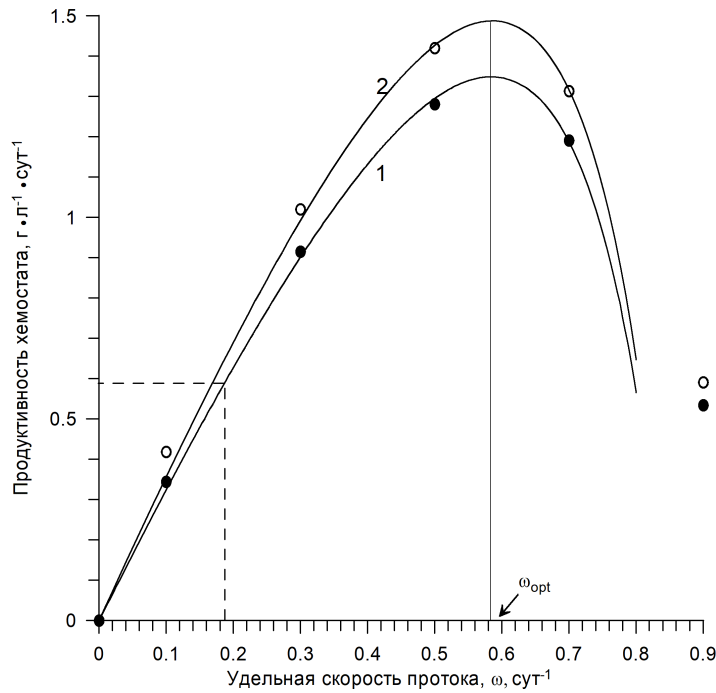


Рис. 7. Зависимость продуктивности хемостата в условиях стационарного динамического равновесия от удельной скорости протока: 1 и 2 — расчёт по уравнению (50) ($R^2 = 0,98$) для одно- и двухступенчатого хемостата соответственно. В расчётах значение для $\omega = 0,9 \text{ сут}^{-1}$ не учитывали (объяснение см. в тексте). Стрелкой указано оптимальное значение удельной скорости протока $\omega_{opt} = 0,59$, при котором достигается максимальная продуктивность. Для сравнительной оценки пунктиром показана продуктивность накопительной культуры [см. (55) и (56)]

Fig. 7. Dependence of the chemostat productivity under conditions of stationary dynamic equilibrium on the dilution rate: 1 and 2 denote calculation according to equation (50) ($R^2 = 0.98$) for a one- and two-stage chemostat, respectively. In the calculations, the value for $\omega = 0.9 \text{ day}^{-1}$ was not taken into account (see text for an explanation). The arrow indicates the optimal value of the dilution rate $\omega_{opt} = 0.59$, at which the maximum productivity is achieved. For a comparative assessment, the dotted line shows the productivity of the batch culture [see (55) and (56)]

Рассчитаем оптимальную удельную скорость протока для условий нашего эксперимента:

$$\omega_{opt} = 1,05 \left(1 - \sqrt{\frac{0,028}{0,115 + 0,028}} \right) = 0,59 \text{ сут}^{-1}. \tag{54}$$

А также по формулам (39), (45) и (50) сделаем расчёт плотности культуры и продуктивности для каждой ступени хемостата при $\omega_{opt} = 0,59 \text{ сут}^{-1}$. По формуле (47) найдём величину урожая одно- и двухступенчатого хемостата при оптимальной скорости протока за четверо суток культивирования. Результаты расчёта представим в табл. 3.

Проведём сравнение количества полученного урожая за фиксированный промежуток времени в условиях накопительного и проточного культивирования. Накопительное культивирование продолжалось пять суток, поэтому расчёты будем вести для $t_n = 5 \text{ сут}$. Если накопительную культуру в момент достижения максимальной плотности B_m (начальный момент стационарной фазы роста) разбавить до исходной плотности B_0 , то рост в накопительной культуре будет продолжен, и максимальная плотность снова будет достигнута через промежуток времени t_n . В условиях повторения циклов разбавления накопительной культуры через промежутки

времени t_n накопительная культура становится частью проточного квазинепрерывного культивирования с промежутком времени между процедурами разбавления $t - t_0 = t_n$. Средняя продуктивность, относительная скорость роста и урожай на этом промежутке могут быть представлены как:

$$\bar{P}_n = \frac{B_m - B_0}{t - t_0} = \frac{B_n}{t_n}; \quad \tilde{\mu}_n = \frac{1}{B_m} \frac{B_m - B_0}{t - t_0} = \frac{\bar{P}_n}{B_m}; \quad B_n = \bar{P}_n \cdot t_n. \quad (55)$$

С другой стороны, ввиду (46) и (47), для квазинепрерывной культуры средняя продуктивность, относительная скорость роста и урожай имеют вид:

$$R_i = \omega \cdot B_i; \quad \tilde{\mu}_1 = \omega; \quad H_{np} = R_i \cdot t_n = \omega \cdot B_i \cdot t_n. \quad (56)$$

Сравнивая продуктивности двух квазинепрерывных культур, (55) и (56), при одинаковой относительной скорости протока в условиях стационарного динамического равновесия ($\omega = \tilde{\mu}_1 = \tilde{\mu}_n$), имеем:

$$\frac{R_i}{\bar{P}_n} = \frac{\omega \cdot B_i}{\tilde{\mu}_n \cdot B_m} = \frac{B_i}{B_m} < 1.$$

Следовательно, для условий $\tilde{\mu}_n = \omega$ накопительное культивирование более выгодно. Однако при увеличении скорости протока, $\tilde{\mu}_n < \omega \leq \omega_{opt}$, более выгодной становится проточная культура. При этом максимальная выгода одноступенчатого хемостата будет достигнута при оптимальной скорости протока ω_{opt} (рис. 7).

Для расчёта продуктивности накопительной культуры подставим численные значения из нашего эксперимента в (55). В результате получим: $\bar{P}_n = 0,62 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$; $\tilde{\mu}_n = 0,19 \text{ сут}^{-1}$; $B_n = 3,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Для расчёта продуктивности хемостата для каждого из стационарных состояний воспользуемся выражением (56). Результаты расчёта внесём в табл. 3.

Таблица 3. Продукционные характеристики культуры *Cylindrotheca closterium* в одно- и двухступенчатом хемостате в условиях стационарного динамического равновесия: ω — удельная скорость протока, сут^{-1} ; B_1, B_2 — плотность культуры в первой и второй ступенях соответственно, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1}$; $\tilde{\mu}_1, \tilde{\mu}_2$ — удельная скорость роста в первой и второй ступенях; R_1, R_2 — продуктивность одно- и двухступенчатого хемостата, $\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$; \bar{P}_2 — продуктивность второй ступени хемостата; $H_1(5), H_2(5)$ — урожай, полученный в одно- и двухступенчатом хемостате за период времени $t_n = 5$ суток, г

Table 3. *Cylindrotheca closterium* production characteristics in a one- and two-stage chemostat under stationary dynamic equilibrium conditions: ω , the dilution rate, day^{-1} ; B_1, B_2 , the culture density in the first and second stages, respectively, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; $\tilde{\mu}_1, \tilde{\mu}_2$, specific growth rate in the first and second stages; R_1, R_2 , productivity of a one- and two-stage chemostat, $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$; \bar{P}_2 , productivity of the chemostat second stage; $H_1(5), H_2(5)$, yield received in a one- and two-stage chemostat over a period of time $t_n = 5$ days, g

ω	B_1	$\tilde{\mu}_1$	R_1	$H_1(5)$	B_2	$\tilde{\mu}_2$	$\bar{P}_2 = R_2 - R_1$	R_2	$H_2(5)$
0,1	3,44	0,1	0,344	1,72	4,19	0,02	0,074	0,419	2,09
0,3	3,05	0,3	0,915	4,58	3,40	0,03	0,106	1,021	5,10
0,5	2,56	0,5	1,281	6,40	2,84	0,05	0,139	1,420	7,10
$\omega_{opt} = 0,59$	2,29	0,59	1,348	6,76	2,54	0,06	0,150	1,498	7,51
0,7	1,70	0,7	1,191	5,95	1,88	0,07	0,123	1,314	6,57
0,9	0,59	0,9	0,534	2,67	0,66	0,09	0,057	0,591	2,96

Из сравнения результатов расчётов видно, что при $\omega = 0,1$ на промежутке времени t_n проточная культура даёт меньший урожай, чем накопительная. Проточное культивирование становится выгодным при больших скоростях протока. Максимальный урожай будет достигнут при оптимальной скорости протока: $R_1(0,59) = 1,35 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$; $H_1(5) = 6,76 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Соответственно, культивирование *C. closterium* в одноступенчатом хемостате выгоднее периодического в 2,2 раза.

Сравним продуктивность одно- и двухступенчатого хемостата при условии поступления в систему культивирования на единицу объёма суспензии микроводорослей одинакового количества лимитирующего субстрата. Рабочий объём каждой ступени хемостата равен V , а значит, суммарный объём суспензии микроводорослей в двухступенчатом хемостате составляет $2V$. Следовательно, для соблюдения условий сравнения необходимо вдвое увеличить рабочий объём одноступенчатого хемостата или вдвое уменьшить удельную скорость протока. Учитывая (24) и (46), запишем:

$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{\omega B_2}{\frac{\omega}{2} B_1} = \frac{2B_2}{B_1} = 2 \cdot q_2 > 1.$$

Отсюда следует, что в указанных выше условиях двухступенчатая система культивирования более продуктивна, чем одноступенчатая. Данные о продуктивности одно- и двухступенчатого хемостата представлены в табл. 3.

Заключение. Проведённые исследования продемонстрировали, что культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* характеризуется достаточно высокими показателями продуктивности как в накопительной, так и в проточной культуре. В накопительной культуре удельная скорость роста $\mu_n = 0,7 \text{ сут}^{-1}$, а время удвоения биомассы $t_d = 0,987 \text{ сут}$. В проточной культуре при критической скорости разбавления предельное значение удельной скорости роста культуры $\tilde{\mu}_1$ составляет $0,84 \text{ сут}^{-1}$. Для условий нашего эксперимента в одно- и двухступенчатом хемостате максимальная продуктивность зарегистрирована при оптимальной скорости протока $\omega_{opt} = 0,59 \text{ сут}^{-1}$ ($R_1 = 1,348 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ и $R_2 = 1,498 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ соответственно). Экспериментально показано, что в проточной культуре продуктивность *C. closterium* в 2,2 раза выше, чем в периодической.

На основе экспериментальных данных проведён расчёт двух параметров уравнения Моно — максимальной удельной скорости роста μ_m и константы насыщения K_S — при лимитировании роста *C. closterium* кремнием; значения составили $1,05 \text{ сут}^{-1}$ и $0,028 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно. Также рассчитана наблюдаемая потребность *C. closterium* в кремнии в проточной культуре $Y_{пр} = 35 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$. Показано, что наблюдаемая потребность в кремнии в проточной культуре ниже, чем в накопительной, на 7,9 %. Заметим: величины μ_m , K_S и $Y_{пр}$ являются важными физиологическими характеристиками диатомовой водоросли *C. closterium* и играют ключевую роль при проектировании промышленных систем для интенсивного культивирования микроводорослей.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления производственными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации 121030300149-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Зозуля Ю. В., Уваров И. П., Репков А. П., Лелеков А. С. Промышленная технология производства биомассы морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin с использованием газовихревого фотобиореактора // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2016. № 1–1. С. 73–77. [Gevorgiz R. G., Zheleznova S. N., Zozulya Yu. V., Uvarov I. P., Repkov A. P., Lelekov A. S. Industrial production

- technology biomass marine diatoms *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin using gas vortex photobioreactor. *Aktual'nye voprosy biologicheskoi fiziki i khimii*, 2016, no. 1–1, pp. 73–77. (in Russ.)]
2. Геворгиз Р. Г., Железнова С. Н., Никонова Л. Л., Бобко Н. И., Нехорошев М. В. Оценка плотности культуры фототрофных микроорганизмов методом йодатной окисляемости. Севастополь, 2015. 31 с. (Препринт / Институт морских биологических исследований имени А. О. Ковалевского, РАН). [Gevorgiz R. G., Zheleznova S. N., Nikonova L. L., Bobko N. I., Nekhoroshev M. V. *Otsenka plotnosti kul'tury fototrofnikh mikroorganizmov metodom iodatnoi okislyaemosti*. Sevastopol, 2015, 31 p. (Preprint / A. O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS). (in Russ.)]. URL: <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/43>
 3. Гительзон И. И., Фиш А. М., Чумакова Р. И., Кузнецов А. М. Максимальная скорость размножения бактерий и возможность её определения // Доклады Академии наук СССР. 1973. Т. 211, № 6. С. 1453–1455. [Gitelzon I. I., Fish A. M., Chumakova R. I., Kuznetsov A. M. Maximum reproduction rate of bacteria and the possibility of its determination. *Doklady Akademii nauk SSSR*, 1973, vol. 211, no. 6, pp. 1453–1455. (in Russ.)]
 4. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г. Интенсивная культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // Вопросы современной альгологии. 2014. № 1 (5). [Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G. Intensive culture of diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. *Voprosy sovremennoi algologii*, 2014, no. 1 (5). (in Russ.)]. URL: <http://algology.ru/474>
 5. Железнова С. Н., Бобко Н. И., Геворгиз Р. Г., Нехорошев М. В. Баланс железа в плотной культуре диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J. C. Lewin // Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений : сборник материалов всероссийской научной конференции с международным участием и школы для молодых учёных, посвящённых 125-летию Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН, Москва, 23–27 ноября 2015 г. Москва : ИФР РАН, 2015а. С. 238–241. [Zheleznova S. N., Bobko N. I., Gevorgiz R. G., Nekhoroshev M. V. Balans zheleza v plotnoi kul'ture diatomovoi vodorosli *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & J. C. Lewin. In: *Fundamental'nye i prikladnye problemy sovremennoi eksperimental'noi biologii rastenii* : sbornik materialov Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiyem i shkoly dlya molodykh uchenykh, posvyashchennykh 125-letiyu Instituta fiziologii rastenii imeni K. A. Timiryazeva RAN, Moscow, 23–27 November, 2015. Moscow : IFR RAN, 2015a, pp. 238–241. (in Russ.)]
 6. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г., Бобко Н. И., Лелеков А. С. Питательная среда для интенсивной культуры диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – перспективного объекта биотехнологий // Актуальная биотехнология. 2015b. № 3 (14). С. 46–48. [Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G., Bobko N. I., Lelekov A. S. The culture medium for the intensive culture of diatomic alga *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin – promising biotech facility. *Aktual'naya biotekhnologiya*, 2015b, no. 3 (14), pp. 46–48. (in Russ.)]
 7. Железнова С. Н. Производственные характеристики морской диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin в интенсивной культуре при различных источниках азота в питательной среде // Морской биологический журнал. 2019. Т. 4, № 1. С. 33–44. [Zheleznova S. N. Production characteristics of the diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin grown in an intensive culture at various nitrogen sources in the medium. *Morskoj biologicheskij zhurnal*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 33–44. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.1.04>
 8. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г. Измерение плотности культур диатомовых водорослей различными методами // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2020. Т. 5, № 1. С. 201–207. [Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G. Measurement of diatom cultures density by various methods. *Aktual'nye voprosy biologicheskoi fiziki i khimii*, 2020, vol. 5, no. 1, pp. 201–207. (in Russ.)]

9. *Непрерывное культивирование микроорганизмов* : пер. с англ. / под ред. И. Малека, З. Фенцля. Москва : Пищевая промышленность, 1968. 546 с. [*Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms* : transl. from Engl. / I. Málek, Z. Fencel (Eds). Moscow : Pishchevaya promyshlennost', 1968, 546 p. (in Russ.)]
10. Перт С. Дж. *Основы культивирования микроорганизмов и клеток* / пер. с англ. Т. А. Петровой, И. Н. Позмоговой ; под ред. И. Л. Работновой. Москва : Мир, 1978. 330 с. [Pirt S. J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation* / transl. from Engl. by T. A. Petrova, I. N. Pozmogova ; I. L. Rabotnova (Ed.). Moscow : Mir, 1978, 330 p. (in Russ.)]
11. Тренкеншу Р. П. Простейшие модели роста микроводорослей. 2. Квазинепрерывная культура // *Экология моря*. 2005. Вып. 67. С. 98–110. [Trenkenshu R. P. Simplest models of microalgae growth. 2. Quasi-continuous culture. *Ekologiya morya*, 2005, iss. 67, pp. 98–110. (in Russ.)]. URL: <https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4659>
12. Фенцл З. Теоретический анализ систем непрерывных культур // *Непрерывное культивирование микроорганизмов: теоретические и методологические основы* : пер. с англ. / под ред. И. Малека, З. Фенцля. Москва : Пищевая промышленность, 1968. С. 64–150. [Fencel Z. Theoretical analysis of continuous culture systems. In: *Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms* : transl. from Engl. / I. Málek, Z. Fencel (Eds). Moscow : Pishchevaya promyshlennost', 1968, pp. 64–150. (in Russ.)]
13. Abinandan S., Subashchandrabose S. R., Venkateswarlu K., Megharaj M. Nutrient removal and biomass production: Advances in microalgal biotechnology for wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, vol. 38, iss. 8, pp. 1244–1260. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1472066>
14. Baldisserotto C., Sabia A., Ferroni L., Pancaldi S. Biological aspects and biotechnological potential of marine diatoms in relation to different light regimens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, vol. 35, iss. 2, art. no. 35 (9 p.). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2607-z>
15. Bozarth A., Maier U.-G., Zauner S. Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 82, iss. 2, pp. 195–201. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1804-8>
16. de la Cuesta J. L., Manley S. L. Iodine assimilation by marine diatoms and other phytoplankton in nitrate-replete conditions. *Limnology and Oceanography*, 2009, vol. 54, iss. 5, pp. 1653–1664. <https://doi.org/10.4319/lo.2009.54.5.1653>
17. Creswell L. R. *Phytoplankton Culture for Aquaculture Feed*. [Stoneville, MS : Southern Regional Aquaculture Center], 2010, 13 p. (SRAC Publication ; no. 5004).
18. Guillard R. R. L., Ryther J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 1962, vol. 8, no. 2, pp. 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
19. Guillard R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: *Culture of Marine Invertebrates Animals* / M. L. Smith, M. H. Chanley (Eds). New York : Plenum Press, 1975, pp. 29–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
20. Herbert D., Elsworth R., Telling R. C. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. *The Journal of General Microbiology*, 1956, vol. 14, iss. 3, pp. 601–622. <https://doi.org/10.1099/00221287-14-3-601>
21. Kiran M. T., Bhaskar M. V., Tiwari A. Phycoremediation of eutrophic lakes using diatom algae. In: *Lake Sciences and Climate Change* / M. N. Rashed (Ed). London : IntechOpen, 2016, pp. 103–115. <https://doi.org/10.5772/64111>
22. Lauritano C., Andersen J. H., Hansen E., Albrigtsen M., Escalera L., Esposito F., Helland K., Hanssen K. Ø., Romano G., Ianora A. Bioactivity screening of microalgae for antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, anti-diabetes, and antibacterial activities. *Frontiers in Marine Science*, 2016, vol. 3, art. no. 68 (12 p.). <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00068>
23. Lincoln R. A., Strupinski K., Walker J. M. Biologically active compounds from diatoms. *Diatom Research*, 1990, vol. 5, iss. 2, pp. 337–349. <https://doi.org/10.1080/0269249X.1990.9705124>
24. Lu X., Sun H., Zhao W., Cheng K.-W., Chen F., Liu B. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process for production of fucoxanthin

- by the marine diatom *Nitzschia laevis*. *Marine Drugs*, 2018, vol. 16, iss. 7, art. no. 219 (13 p.). <https://doi.org/10.3390/md16070219>
25. Maxon W. D. Continuous fermentation: A discussion of its principles and applications. *Applied Microbiology*, 1955, vol. 3, no. 2, pp. 110–122. <https://doi.org/10.1128/am.3.2.110-122.1955>
26. *Methods in Microbiology* / J. R. Norris, D. W. Ribbons (Eds). London ; New York : Academic Press, 1970, vol. 2, 445 p. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70210-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70210-1)
27. Minyuk G. S., Chelebieva E. S., Chubchikova I. N. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova (Chlorophyta) in a two-stage culture. *International Journal on Algae*, 2014, vol. 16, iss. 4, pp. 354–368. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i4.50>
28. Nagappan S., Devendran S., Tsai P.-C., Dahms H.-U., Ponnusamy V. K. Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 2019, vol. 252, pp. 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.04.138>
29. Patras D., Moraru C. V., Socaciu C. Screening of bioactive compounds synthesized by microalgae: A progress overview on extraction and chemical analysis. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, Seria Chimia*, 2018, vol. 63, iss. 1, pp. 21–35. <http://dx.doi.org/10.24193/subbchem.2018.1.02>
30. Salleh S., McMinn A. The effects of temperature on the photosynthetic parameters and recovery of two temperate benthic microalgae, *Amphora* cf. *coffeaeformis* and *Cocconeis* cf. *sublittoralis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 2011, vol. 47, iss. 6, pp. 1413–1424. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01079.x>
31. Sathasivam R., Radhakrishnan R., Hashem A., Abd_Allah E. F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, vol. 26, iss. 4, pp. 709–722. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
32. Singh J., Dhar D. W. Overview of carbon capture technology: Microalgal biorefinery concept and state-of-the-art. *Frontiers in Marine Science*, 2019, vol. 6, art. no. 29 (9 p.). <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00029>
33. Stock W., Vanelslander B., Rüdiger F., Sabbe K., Vyverman W., Karsten U. Thermal niche differentiation in the benthic diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) complex. *Frontiers in Microbiology*, 2019, vol. 10, art. no. 1395 (12 p.). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01395>
34. Wang S., Chen J., Li Z., Wang Y., Fu B., Han X., Zheng L. Cultivation of the benthic microalga *Prorocentrum lima* for the production of diarrhetic shellfish poisoning toxins in a vertical flat photobioreactor. *Biore-source Technology*, 2015, vol. 179, pp. 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.019>
35. Wang S., Verma S. K., Said I. H., Thomsen L., Ullrich M. S., Kuhnert N. Changes in the fucoxanthin production and protein profiles in *Cylindrotheca closterium* in response to blue light-emitting diode light. *Microbial Cell Factories*, 2018, vol. 17, art. no. 110 (13 p.). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0957-0>
36. Wollmann F., Dietze S., Ackermann J.-U., Bley T., Walther T., Steingroewer J., Krujatz F. Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, 2019, vol. 19, iss. 12, pp. 860–871. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>
37. Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G., Nekhoroshev M. V. Conditions optimization of the *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann et Lewin cultivation in order to obtain a high yield of fucoxanthin. In: *3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry*, Kazan, 28 Sept. – 03 Oct., 2017 : abstr. book. Kazan : Kazan Federal University, 2017, pp. 261.

**PRODUCTION CHARACTERISTICS OF A CULTURE OF THE DIATOM
CYLINDROTHECA CLOSTERIUM (EHRENBERG) REIMANN ET LEWIN
IN A TWO-STAGE CHEMOSTAT**

R. G. Gevorgiz¹, S. N. Zheleznova¹, and A. S. Malakhov²

¹A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

²National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

E-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

The advantages and disadvantages of flow and batch microalgae cultivation are discussed. The benefits of the flow cultivation are indicated, in particular in a quasi-continuous mode in a two-stage chemostat. It is proposed to use the culture of the benthic diatom *Cylindrotheca closterium* as a producer of valuable substances since this species has several useful properties of both biological and technological nature. Specifically: 1) *C. closterium* is characterized by relatively high production rates; 2) it efficiently utilizes light energy which removes restrictions on the location of production in areas with a small number of sunny days *per year*; 3) it has a rather low temperature optimum for growth which is significant for the implementation of industrial technologies in Russian Federation; and 4) it has the specific density of cells of more than one, therefore, cells quickly enough sink to the photobioreactor bottom in the absence of the culture aeration (this simplifies the separation of biomass from the culture medium and reduces its cost). The aim of this work is to analyze the production characteristics of the quasi-continuous *C. closterium* culture in the two-stage chemostat. The studies were carried out at a temperature of (20 ± 1) °C and irradiation of $150 \mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. The chemostat for *C. closterium* cultivation consisted of two glass 3-L photobioreactors of the plane-parallel type, each having a working thickness of 5 cm and a working surface of 0.03 m^2 . The cultivation was carried out on the nutrient medium RS with a constant aeration (the speed was of 1.5 L of air *per* 1 L of culture *per min*). The culture was examined at different dilution rates of the nutrient medium: 0.1; 0.3; 0.5; 0.7; and 0.9 day^{-1} . The growth parameters of the batch culture were calculated: the specific growth rate $\mu_{\text{H}} = 0.7 \text{ day}^{-1}$; the time for doubling the biomass $t_d = 0.987$ days. The maximum productivity of a one- and two-stage chemostat was registered at the optimal dilution rate of 0.59 day^{-1} ; the values were 1.348 and $1.498 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, respectively. As found experimentally, *C. closterium* productivity in the flow culture is 2.2 times higher than in the batch culture. The experimental data were used to calculate the maximum specific growth rate μ_m and the saturation constant K_S with limiting *C. closterium* growth by silicon; the values were 1.05 day^{-1} and $0.028 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. It was shown that the observed need for silicon in the flow culture ($Y_{\text{np}} = 35 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) is lower by 7.9 % than in the batch culture ($Y_{\text{H}} = 38 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). For the diatom *C. closterium*, μ_m , K_S , and Y_{np} are important physiological characteristics; those play the key role in the design of industrial systems for intensive microalgae cultivation.

Keywords: *Cylindrotheca closterium*, chemostat, mathematical model