

УДК 582.232:574.55:577.114

ПРОДУКТИВНОСТЬ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБАХ ВНЕСЕНИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА В КУЛЬТУРУ

© 2017 г. **И. Н. Гудвилевич**, канд. биол. наук, с. н. с., **А. Б. Боровков**, канд. биол. наук, с. н. с.

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

E-mail: gudirina2008@yandex.ru

Поступила в редакцию 05.02.2017 г. Принята к публикации 23.06.2017 г.

Недостаток углерода может являться основным лимитирующим фактором при выращивании микроводорослей, поэтому подбор оптимального способа подачи углерода в культуральную среду для конкретной культуры и фотобиореактора является определяющим для их интенсивного культивирования. Культуру микроводоросли *Dunaliella salina* выращивали в лабораторных фотобиореакторах плоскопараллельного типа при круглосуточном искусственном освещении 15 кЛк. Подачу воздуха осуществляли аквариумным компрессором со скоростью 0.8 л·л⁻¹·мин⁻¹ культуры в минуту. В первом варианте барботаж осуществляли через стеклянную трубку, во втором — через специальный распылитель воздуха. Экспериментально показана возможность интенсивного выращивания культуры *D. salina* на распыляемом атмосферном воздухе с максимальной продуктивностью 0.34 г сухой биомассы с 1 л в сутки. Проведена сравнительная оценка затрат для выращивания культуры зелёной микроводоросли *D. salina* на распыляемом атмосферном воздухе и с дополнительным введением CO₂ в газоздушную смесь.

Ключевые слова: *D. salina*, интенсивная культура, максимальная продуктивность, углекислый газ, воздух

Исследования по подбору и оптимизации режимов получения плотных высокопродуктивных культур особенно актуальны для биотехнологически ценных видов микроводорослей. Так, зелёная галофильная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod., известная своей уникальной способностью накапливать в клетках более 10 % β-каротина, культивируется в промышленных масштабах в ряде стран с 50-х годов прошлого века. Кроме того, данная микроводоросль — классический модельный объект, культура которой способна расти с высокой скоростью и выдерживать широкий спектр воздействия экстремальных факторов. Общеизвестно, что выращивание дуналиеллы для получения биомассы, обогащённой β-каротином, осуществляется в две стадии: на первой происходит активный рост культуры и накопление биомассы, а на второй происходит накопление β-каротина в клетках микроводоросли, но отсутствует рост культуры [6, 11]. Однако первоначальный этап — наращивание биомассы за минимальный временной период — основа для производства любых ценных веществ. Осуществляется это обычно в накопительном режиме, который является основой самого простого из разработанных на сегодняшний день методов культивирования [11]. Для обеспечения на этом этапе активного роста культуры и деления клеток *D. salina*, как и любых других фототрофов, необходим достаточный уровень элементов минерального питания в среде — биогенных элементов. Высокая скорость роста микроводорослей при интенсивном выращивании в значительной степени зависит от содержания достаточного количества углерода в доступной форме в питательной среде, а его недостаток может являться основным лимитирующим фактором, сдерживающим рост водорослей [2, 8, 13, 15]. При автотрофном

выращивании снабжение водорослей углеродом обычно осуществляется с помощью газовой смеси (воздух + CO₂). Различные режимы подачи углекислоты в жидкую фазу направлены на поддержание оптимальной концентрации углерода в доступной форме в питательной среде. С другой стороны, известно, что углекислый газ в определённых количествах содержится в атмосферном воздухе. Представляется актуальным с помощью ряда технических приёмов интенсифицировать процесс его растворения в культуральной среде в форме, оптимальной для потребления клетками микроводорослей. На сегодняшний день существует ряд исследований на данную тему с неоднозначными результатами в практическом плане [5, 15].

Таким образом, создание условий для интенсификации растворения углекислого газа воздуха в культуральной среде при выращивании микроводоросли *D. salina* и использование его как дешёвого источника углерода является одним из ведущих факторов по снижению себестоимости получаемой биомассы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились с культурой зелёной микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. (штамм IMBR-2) из коллекции культур ФГБУН ИМБИ. Температуру поддерживали на уровне 28 °С, рН среды — 8–9 ед. Культуру микроводоросли выращивали на питательной среде по Тренкеншу [9] в лабораторных фотобиореакторах плоскопараллельного типа толщиной 5 см при круглосуточном искусственном освещении, средняя освещённость на поверхности фотобиореакторов была одинаковой и составляла 15 кЛк. Освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116. Барботаж культур осуществляли аквариумным компрессором, скорость подачи воздуха была одинаковой для обоих фотобиореакторов и составляла 0.8 л·л⁻¹·мин⁻¹. В первом варианте барботаж осуществляли через стеклянную трубку с внутренним диаметром 4 мм с дополнительным введением 3 % CO₂ от объёма подаваемого воздуха, во втором — через аквариумный распылитель воздуха, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см и диаметром 5 мм, у которой диаметр пор не превышает 0.1 мм. Перед отбором проб для определения рН, оптической плотности культуры микроводоросли объём суспензии в фотобиореакторе доводили дистиллированной водой до начального, компенсируя испарение. Оптическую плотность рассчитывали по формуле:

$$D = -lg(T), \quad (1)$$

где T — величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-3 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1 %.

При определении сухого веса культуры микроводоросли величину оптической плотности умножали на эмпирический коэффициент $k = 0.78 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед. опт. пл.}^{-1}$ [2]. Рассчитывали средние арифметические (\bar{X}), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ($\pm \Delta_{\bar{X}}$). Все расчёты проводили для уровня значимости $\alpha = 0.05$. В таблицах и на графиках представлены средние значения; значения ошибок не превышали 5–7 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выращивание микроводорослей предполагает значительные затраты как на техническое оснащение, так и на химические реактивы, в том числе закупку углекислого газа, что в конечном итоге приводит к удорожанию получаемой биомассы. Выходом из такой ситуации может быть использование углекислого газа, содержащегося в воздухе. Предварительно была проведена оценка предельной продуктивности культуры морских микроводорослей при использовании в качестве источника углерода

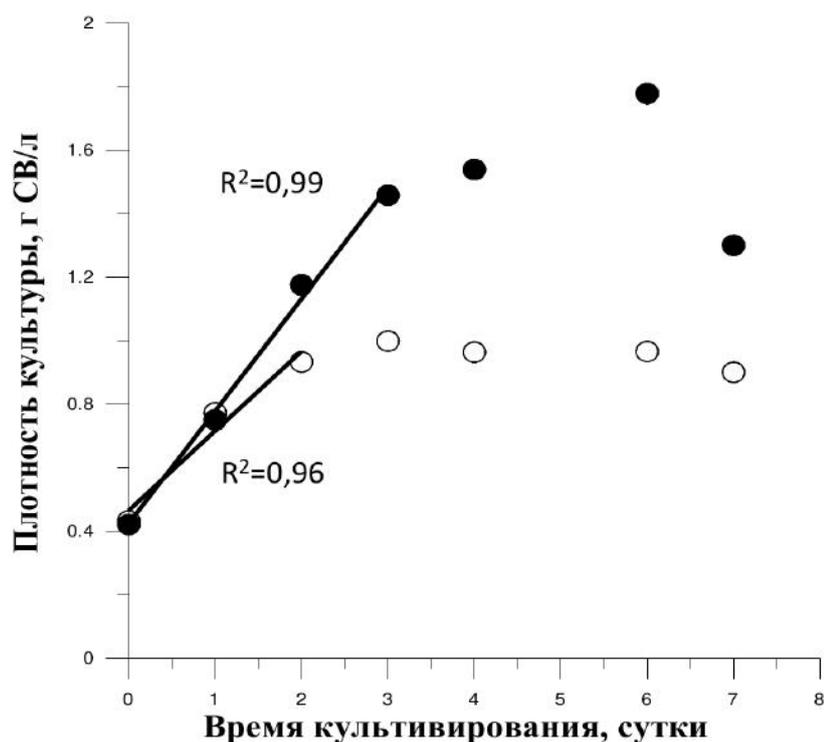


Рис. 1. Накопительные кривые роста *D. salina* при различных способах подачи воздуха в фотобиореактор; ○ — барботаж через аквариумный распылитель воздуха, ● — барботаж через стеклянную трубку с добавлением CO₂. Линия — аппроксимация линейной фазы роста уравнением (2). Значения коэффициентов в тексте

Fig. 1. Cumulative growth curves for *D. salina* under different ways of air injection into photobioreactor; ○ — sparging via aquarium air sprayer, ● — sparging via capillary with addition of CO₂. Linear phase growth approximation line with equation (2). Coefficients values in text

CO₂ воздуха [2]. При этом считали, что: объёмная концентрация углекислого газа в атмосферном воздухе составляет 0.03 % [7]; условия для растворения CO₂ идеальны (углекислый газ полностью переходит в культуральную жидкость); скорость подачи воздуха — 1 л·л⁻¹·мин⁻¹; содержание углерода в биомассе микроводорослей составляет 50 % [10].

Предельное значение продуктивности с 1 л культуры микроводоросли в сутки составило 0.463 г сухой биомассы.

Для верификации полученных значений продуктивности были проведены экспериментальные исследования по выращиванию культуры микроводоросли *D. salina* на распыляемом атмосферном воздухе. В качестве контрольного варианта был выбран режим выращивания при дополнительном внесении CO₂ в газоздушную смесь (рис. 1), когда заранее можно быть уверенным в максимальных значениях продуктивности культуры водорослей.

С учётом заданной скорости подачи воздуха (0.8 л·л⁻¹·мин⁻¹), максимально возможная скорость роста культуры *D. salina* при выращивании на атмосферном воздухе могла составить 0.37 г СВ·л⁻¹·сут⁻¹. Аппроксимация линейной фазы роста уравнением:

$$B = B_l + P_m \cdot t, \quad (2)$$

где B — плотность культуры, B_l — плотность культуры в момент начала линейной фазы роста, P_m — максимальная продуктивность, t — время, позволила определить величины максимальной продуктивности культуры *D. salina* для двух вариантов эксперимента (табл. 1).

Таблица 1. Продуктивность культуры *D. salina* при различных способах подачи воздуха в среду**Table 1.** *D. salina* culture productivity under different ways of air injection into culture medium

Способ подачи воздуха	Продуктивность			
	Предельная (1.0 л·л ⁻¹ ·мин ⁻¹) [5], г СВ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	Предельная (0.8), г СВ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	Максимальная (0.8), г СВ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	Средняя, (0.8), г СВ·л ⁻¹ ·сут ⁻¹
Распыление воздуха	0.46	0.37	0.34	0.19±0.01
Подача через трубку (воздух +3 % CO ₂)	–	–	0.38	0.28±0.02

На сегодняшний день в лабораторных условиях отработаны режимы интенсивного культивирования *D. salina*, способные обеспечить высокую продуктивность культуры для наращивания существенных количеств её биомассы [12, 14]. Однако результаты проведённых ранее экспериментов показали, что скорость роста данной культуры резко снижается при уменьшении концентрации CO₂ в газовой смеси (от 3 до 1 % v/v), поэтому выращивание данной культуры при барботировании воздухом для решения биотехнологических задач нецелесообразно. Теоретическая возможность достижения продуктивности культуры микроводоросли 0.46 г с 1 л в сутки при выращивании на распыляемом воздухе показана предварительными расчётами. Априори получаемые экспериментально значения продуктивности должны быть ниже в силу различных потерь. Первоначальные условия эксперимента были заданы таким образом, чтобы рост культуры ограничивался только уровнем углеродного обеспечения. Известно, что в растворы углекислый газ переходит в формах H₂CO₃, HCO₃⁻, CO₃²⁻, причём бикарбонат-ионы, наиболее предпочтительные при выращивании микроводорослей, преобладают в питательной среде при pH 8.0–8.3 [4]. Также известно, что на растворимость углекислого газа в водной фазе одновременно оказывают влияние различные факторы, важнейшие из которых — pH, температура и солёность. Кроме того, растворимость газов повышается с увеличением удельной площади соприкосновения жидкой и газообразной фаз. Для интенсификации процесса растворения CO₂ в водной среде в форме, оптимальной для использования клетками микроводорослей, при проведении эксперимента создали благоприятные условия – использовали распылитель воздуха и поддерживали подходящую pH культуральной среды.

Максимальная продуктивность культуры *D. salina* как в случае её выращивания на распыляемом атмосферном воздухе, так и в случае дополнительного введения CO₂ в газовоздушную смесь значительно не отличалась. Что касается средней скорости роста микроводоросли при накопительном культивировании, то при выращивании на распылении атмосферного воздуха она была в 1.5 раза ниже, чем при выращивании на газовой смеси с CO₂ (табл. 1). Тем не менее полученные в данном эксперименте значения средней продуктивности при выращивании на распыляемом воздухе сопоставимы с таковыми культуры *D. salina*, выращиваемой с добавлением 1 % CO₂ в газовоздушную смесь [2]. Таким образом, выращивание микроводоросли в накопительном режиме на распыляемом атмосферном воздухе за счёт пролонгированной адаптационной стадии лишено смысла. Можно предположить, что в непрерывном режиме выращивания, когда физико-химические условия не меняются, появится возможность реализовать предлагаемый способ насыщения культуральной среды углекислым газом.

Дополнительное введение CO₂ в газовоздушную смесь значительно увеличивает продукцию культуры *D. salina*, однако повышает стоимость единицы произведённой биомассы. Чтобы определить затра-

ты на углекислый газ, необходимый для выращивания 1 грамма биомассы микроводорослей, провели расчёты, аналогичные предыдущим. При этом также считали, что содержание углерода в биомассе — примерно 50 % [10], поэтому для синтеза 1 г биомассы необходимо подать 0.5 г чистого углерода, или, учитывая долю углерода в углекислом газе, 1.83 г CO_2 . Объём CO_2 определили с учётом известной молярной массы для нормальных условий. Он оказался равным 0.933 л.

То есть для синтеза 1 г сухой биомассы микроводорослей необходимо около 1 л углекислого газа в доступной форме. Учитывая растворимость CO_2 в водной среде при заданных условиях выращивания культуры *D. salina* (рН = 8–9, температура 25–28 °С, концентрация солей около 150 г·л⁻¹) [3], максимальную продуктивность культуры для данных условий (табл. 1), а также стоимость сжиженной углекислоты, для синтеза 1 г сухой биомассы в сутки необходимо использовать 2.6 л углекислого газа, что предполагает дополнительные затраты в денежном эквиваленте — около 42 рублей.

Таким образом, себестоимость 1 г биомассы при использовании CO_2 значительно возрастает, и это без учёта затрат на установку, техническое оснащение и обслуживание углекислотной системы. Кроме того, эффективность использования газообразной CO_2 при выращивании микроводорослей на концентрированных средах снижается, так как его растворимость в жидкой среде при оптимальных условиях культивирования невысока (около 35 %) [3]. Следовательно, выращивание *D. salina* на распыляемом атмосферном воздухе более выгодно, чем использование газовой смеси, обогащённой CO_2 , так как, несмотря на снижение продукции, стоимость единицы получаемой биомассы будет ниже. Можно также предположить, что увеличение площади распылителя повысит продуктивность культуры, что, в свою очередь, позволит продолжить данное исследование. Возможно, увеличив в 3 раза площадь распылителя, удастся достичь продуктивности культуры, характерной для использования газовой смеси, обогащённой CO_2 .

Заключение. Проведена сравнительная оценка затрат для выращивания культуры зелёной микроводоросли *D. salina* как с дополнительным введением CO_2 в газоздушную смесь, так и без него, только за счёт повышения растворимости углекислого газа воздуха при увеличении удельной поверхности соприкосновения фаз воздух — жидкая среда. Показано, что культивирование дуналиеллы в апробированном режиме имеет преимущество по стоимости единицы получаемой биомассы по сравнению с её выращиванием в сопоставимых условиях с использованием углекислого газа.

Показана возможность интенсивного выращивания *D. salina* без дополнительного введения CO_2 в газоздушную смесь (только на распыляемом воздухе). Экспериментально показано, что при таком способе выращивания максимальная продуктивность культуры *D. salina* составляет 0.34 г СВ с 1 л в сутки, а средняя за 4 суток выращивания — 0.19 г СВ с 1 л культуры в сутки (при скорости продувки 0.8 л·л⁻¹·мин⁻¹). Дополнительное введение CO_2 в газоздушную смесь при аналогичной скорости подачи не оказывало значительного влияния на максимальную продуктивность культуры *D. salina*. Полученные данные согласуются с проведёнными предварительными расчётами и оставляют простор для оптимизации способа культивирования на распыляемом атмосферном воздухе для повышения скорости роста культуры.

Работа выполнена в рамках госзадания ФГБУН ИМБИ, тема № 1001-2014-0017.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Боровков А. Б. *Динамика пигментов и роста микроводорослей в хемостате на примере Dunaliella salina Teod.* : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Севастополь, 2008. 28 с. [Borovkov A. B. *Dinamika pigmentov i rosta mikrovodoroslei v khemostate na primere Dunaliella salina Teod.* : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Sevastopol, 2008, 28 p. (in Russ.)].
2. Боровков А. Б., Гудвиллович И. Н. Влияние концентрации CO_2 в газовой смеси на продукционные характеристики квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* // *Актуальные вопросы теории и практики современной биотехнологии* : материалы Всерос. науч.-практ. конф. (Луга, 15 сент. 2015 г.). Санкт-Петербург, 2015. С. 6–13. [Borovkov A. B., Gudvilovich I. N. Vliyanie kontsentratsii

- SO₂ v gazovoi smesi na produktsionnye kharakteristiki kvazinepreryvnoi kul'tury *Dunaliella salina*. In: *Aktual'nye voprosy teorii i praktiki sovremennoi biotekhnologii* : materialy Vseros. nauch.-prakt. konf. (Luga, 15 Sept. 2015). Saint-Petersburg, 2015. P. 6–13. (in Russ.).
3. Гороновский И. Т., Назаренко Ю. П., Некряч Е. Ф. *Краткий справочник по химии*. Киев: Наук. думка, 1987. 829 с. [Goronovsky I. T., Nazarenko Yu. P., Nekryach E. F. *Kratkii spravochnik po khimii*. Kiev: Nauk. dumka, 1987, 829 p. (in Russ.).]
 4. Крупнова Т. Г., Сухарев Ю. И. *Химия окружающей среды: учебное пособие*. Челябинск: Изд-во ЮУрГУ, 2005. Ч. 2. 36 с. [Krupnova T. G., Sukharev Yu. I. *Khimiya okruzhayushchei sredy: uchebnoe posobie*. Chelyabinsk: Izd-vo YuUrGU, 2005, pt. 2, 36 p. (in Russ.).]
 5. Лелеков А. С., Гудвилевич И. Н., Геворгиз Р. Г., Тренкеншу Р. П., Бадисова А. О. Оценка коэффициента абсорбции углерода культурой *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross // *Морские биологические исследования: достижения и перспективы*: в 3-х т. : сборник материалов Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, приуроч. к 145-летию Севастопольской биологической станции (Севастополь, 19-24 сент. 2016 г.) / под общ. ред. А. В. Гаевской. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016. Т. 3. С. 404–407. [Lelekov A. S., Gudvilovich I. N., Gevorgiz R. G., Trenkenshu R. P., Badisova A. O. Otsenka koeffitsienta absorbtсии ugleroda kul'turoi *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. In: *Morskie biologicheskie issledovaniya: dostizheniya i perspektivy*: v 3-kh t. : sbornik materialov Vseros. nauch.-prakt. konf. s mezhdunar. uchastiem, priuroch. k 145-letiyu Sevastopol'skoi biologicheskoi stantsii (Sevastopol, 19-24 Sept. 2016) / pod obshch. red. A. V. Gaevskoi. Sevastopol: EKOSI-Gidrofizika, 2016, vol. 3, pp. 404–407. (in Russ.).]
 6. Масюк Н. П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella Teod.** Киев: Наук. думка, 1973. 487 с. [Masyuk N. P. *Morfologiya, sistematika, ekologiya, geograficheskoe rasprostranenie roda Dunaliella Teod.* Kiev: Nauk. Dumka, 1973, 487 p. (in Russ.).]
 7. Полевой В. В. *Физиология растений*. Москва: Высшая школа, 1989. 464 с. [Polevoi V. V. *Fiziologiya rastenii*. Moscow: Vysshaya shkola, 1989, 464 p. (in Russ.).]
 8. Пронина Н. А. Организация и физиологическая роль CO₂-концентрирующего механизма при фотосинтезе микроводорослей // *Физиология растений*. 2000. Т. 47, № 5. С. 801–810. [Pronina N. A. Organizatsiya i fiziologicheskaya rol' CO₂-kontsentriruyushchego mekhanizma pri fotosinteze mikrovodoroslei. *Fiziologiya rastenii*, 2000, vol. 47, no. 5, pp. 801–810. (in Russ.).]
 9. Тренкеншу Р. П. *Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре* : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Красноярск, 1984. 28 с. [Trenkenshu R. P. *Rostovye i fotoenergeticheskie kharakteristiki morskikh mikrovodoroslei v plotnoi kul'ture*: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk. Krasnoyarsk, 1984, 28 p. (in Russ.).]
 10. Anderson L. A. On the hydrogen and oxygen-content of marine phytoplankton. *Deep Sea Research Pt. I*, 1995, vol. 42, pp. 1675–1680.
 11. Ben-Amotz A. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species – *Dunaliella*. In: *Handbook of microalgal culture*. Oxford: Blackwell, 2004, pp. 273–280.
 12. Borovkov A. B., Gudvilovich I. N. Intensive cultivation of *Dunaliella salina* for production of biomass with elevated β-carotene content. Communication 1. Effect of cultivation factors. *Hydrobiological Journal*, 2015, vol. 51, no. 3, pp. 69–76.
 13. Giordano M., Bowes G. Gas exchange and C allocation in *Dunaliella salina* cells in response to the N source and CO₂ concentration used for growth. *Plant Physiology*, 1997, vol. 115, pp. 1049–1056.
 14. Ramos A. A., Polle J., Tran D., Cushman J. C., Jin E.-S., Varela J. C. The unicellular green alga *Dunaliella salina* Teod. as a model for abiotic stress tolerance: genetic advances and future perspectives. *Algae*, 2011, vol. 26, no. 1, pp. 3–20.
 15. Ying K., Al-Mashhadani M. K. H., Hanotu J. O., Gilmour D. J., Zimmerman W. B. Enhanced mass transfer in microbubble driven airlift bioreactor for microalgal culture. *Engineering*, 2013, vol. 5, pp. 735–743.

***DUNALIELLA SALINA* TEOD. MICROALGAE PRODUCTIVITY,
WHEN GROWN UNDER THE DIFFERENT ADDITION
OF CARBON DIOXIDE IN CULTURE**

I. N. Gudvilovich, A. B. Borovkov

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

E-mail: gudirina2008@yandex.ru

Lack of carbon can be the main limiting factor in microalgae cultivation, that is why selection of optimum way for carbon to be injected into the culture environment for a particular species and photobioreactor is critical for its mass cultivation. *D. salina* culture was grown in laboratory photobioreactors under day-and-night lamplight of 15 kLx. Air was supplied with the aquarium compressor at the rate of $0.8 \text{ l} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. In the first test, bubbling was arranged via capillary of 4 mm diameter; in the second test — via aquarium air sprayer (plastic tube 5 cm length, 5 mm diameter, pore size not more than 0.1 mm). *D. salina* potential for the microalgae mass cultivation through increase of specific air-fluid phase surface (without additional CO₂ injection into gas-air mixture) with maximum productivity of 0.34 g of dry biomass from 1 liter per day has been shown experimentally. Average productivity of the culture when grown in the proposed regime is 1.5 times lower than in standard approved case.

Keywords: *D. salina*, mass culture, maximum productivity, carbon dioxide, air