

ГИДРОКАРБОНАТ НАТРИЯ КАК ИСТОЧНИК УГЛЕРОДА ДЛЯ ИНТЕНСИВНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS. В ПРОМЫШЛЕННЫХ МАСШТАБАХ

Геворгиз Р.Г.¹, Железнова С.Н.¹, Уваров И.П.²

¹ ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» РАН,
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² ГБУ Новосибирской области «Управление ветеринарии города Новосибирска»
г. Новосибирск, РФ

Поступила в редакцию: 30.07.2021

Аннотация. В работе представлены экспериментальные доказательства использования бикарбоната натрия в качестве единственного источника углерода при интенсивном культивировании *Porphyridium purpureum*. Показано, что питательные среды для интенсивного культивирования *P. purpureum* на основе морской воды могут содержать до 20 г·л⁻¹ и более бикарбоната натрия в качестве источника углерода. При использовании питательной среды с бикарбонатом натрия максимальная плотность культуры достигала 3 г.с.б.·л⁻¹ и более. Максимальная продуктивность в лабораторных фотобиореакторах достигала 1,16 г·л⁻¹·сут⁻¹. При культивировании *P. purpureum* в промышленных масштабах при естественном освещении продуктивность культуры зависела от световых условий. В пасмурную погоду, когда максимальная освещенность в течение суток составляла 7–12 клк, продуктивность достигала 6,33 г.с.б.·м⁻²·сут⁻¹. В то время как в солнечную погоду (максимальная освещенность рабочей поверхности в течение дня 50 клк) продуктивность составила 17,7 г.с.б.·м⁻²·сут⁻¹. Отмечено, что при высокой облученности у накопительных кривых не наблюдалось стационарной фазы роста. При достижении максимальной плотности культура переходила в фазу отмирания. Сделано предположение о том, что это связано с высокими значениями рН, при которых многие биогенные элементы становятся недоступными для клеток в связи с малой растворимостью некоторых солей в щелочной среде, а также переходу всех форм неорганического углерода в карбонатную форму.

Ключевые слова: низшие фототрофы, питательная среда, красные микроводоросли, углерод-концентрирующий механизм, пищевая сода.

Традиционно при культивировании *Porphyridium purpureum* как в лабораторных, так и в промышленных масштабах в качестве единственного источника углерода используют углекислоту из баллона [1]. В исключительных случаях также используют органические источники углерода [2], но они не получили широкого распространения для промышленных масштабов из-за возникающих проблем обильного развития сопутствующих микроорганизмов.

Известно, что красные микроводоросли являются результатом первичного эндосимбиоза цианобактерий и гетеротрофных организмов, поэтому они унаследовали многие свойства своих прородителей [3–5]. Одним из таких свойств является способность поглощения неорганического углерода как в форме углекислоты, так и в форме бикарбонат-иона [6,7]. Поэтому *P. purpureum* растет как в слабокислой, так и в щелочной среде. Именно такая особенность углеродного метаболизма позволяет *P. purpureum* расти и вегетировать в водоёмах с широким диапазоном рН.

Способность поглощать гидрокарбонат-ионы клетками микроводорослей позволяет в качестве источника углерода при интенсивном культивировании использовать гидрокарбонат натрия (пищевая сода). По справочным данным растворимость пищевой соды достаточно высока и составляет более 90 г·л⁻¹, поэтому гидрокарбонат натрия используют в питательных средах для интенсивного культивирования многих видов микроводорослей. Примером такой среды является питательная среда Заррук для спирулины. Важно также отметить, что наличие гидрокарбонат-ионов в питательной среде повышает буферность питательного раствора, что приводит к исключению резких изменений рН среды.

P. purpureum является представителем морских видов красных водорослей. Поэтому все питательные среды для его интенсивного культивирования готовят на основе морской воды, например, питательная среда Тренкеншу [8]. Отметим, что в состав питательных сред для *P. purpureum* источник углерода обычно не входит, поскольку предполагается, что в процессе культивирования в суспензию будет подаваться углекислота. Можно упомянуть лишь отдельные исследования, в которых использовался гидрокарбонат натрия в небольших количествах с целью увеличения буферности среды [6,7,9]. При выращивании *P. purpureum* в промышленных масштабах в качестве источника углерода практически всегда используется CO₂. Однако при интенсивном культивировании микроводорослей в промышленных масштабах не всегда целесообразно использовать углекислоту для обеспечения клеток углеродом. Например, при выращивании водорослей в фотобиореакторах типа бассейн с глубиной 8–10 см растворение CO₂ из баллона в суспензии сопровождается немалыми техническими трудностями. Более удобным с технологической точки зрения является гидрокарбонат натрия.

В данной работе была поставлена цель получения интенсивной культуры *Porphyridium purpureum* в промышленных масштабах, у которой в качестве источника углерода используется гидрокарбонат натрия.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследовалась культура *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross, полученная из коллекции ФИЦ ИнБЮМ РАН. Альгологически чистую культуру выращивали на модифицированной питательной среде Тренкеншу [8]. Модификация среды заключалась в добавлении различных порций гидрокарбоната натрия и уменьшения навески фосфата калия до $0,2 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$. Для приготовления питательных сред использовалась фильтрованная черноморская вода. Культуру адаптировали к условиям интенсивного культивирования на люминистате при 5 клк, используя накопительный метод культивирования. После адаптации часть объёма культуры использовали для лабораторных экспериментов, а часть для выращивания в промышленном фотобиореакторе.

Лабораторные исследования проводили осенью 2018 г в фотобиореакторах плоскопараллельного типа объёмом 1 л с рабочей толщиной в 2 см. Культуру перемешивали посредством барботажа воздухом без дополнительной подачи CO_2 из баллона. В качестве источника освещения использовали люминесцентные лампы. Освещённость рабочей поверхности для лабораторного фотобиореакторов составляла 7-10 клк. Для наращивания *P. purpureum* в полупромышленных масштабах использовали фотобиореактор типа бассейн объёмом 70 л освещением лампой ДРЛ-700, которая на рабочей поверхности фотобиореактора в среднем давала 10 клк (рис. 1). Для перемешивания культуры использовали аквариумную погружную помпу. По достижении стационарной фазы роста суспензию клеток использовали в качестве инокулята для культивирования в промышленных фотобиореакторах при естественном освещении.

Промышленный фотобиореактор типа бассейн, расположенный в тепличном комплексе на территории лабораторного корпуса ИнБЮМ (г. Севастополь), использовали для проведения исследований при естественном освещении. Рабочий объём фотобиореактора составлял 254 л, освещаемая поверхность – $2,54 \text{ м}^2$, рабочий слой (глубина) – 10 см. Суспензия микроводорослей в фотобиореакторах перемешивалась посредством механической мешалки, скорость вращения которой была неизменной в течение всего эксперимента и составляла $20 \text{ об}\cdot\text{мин}^{-1}$. Для поддержания оптимальной температуры суспензии использовали систему термостабилизации, при этом на протяжении всего времени культивирования отклонение от оптимальной температуры составляло не более 3°C .

Изменение плотности культуры в фотобиореакторе осуществляли двумя методами: 1. Путём измерения оптической плотности суспензии в кювете 0,5 см на длине волны 750 нм; 2. Путём взвешивания сырого осадка (биомассы водорослей) на аналитических весах после центрифугирования суспензии в полипропиленовых пробирках при 1600 г в течение 15 мин. Перед взвешиванием сырую биомассу промывали изотоническим раствором хлористого натрия ($6 \text{ г}\cdot\text{л}^{-1}$) для удаления экзополисахаридов. По результатам 30 параллельных измерений по методу наименьших квадратов была найдена линейная зависимость оптической плотности от сухой биомассы *P. purpureum* ($R^2=0.99$):

$$D_{750} = 0,395 \cdot V_{\text{сух}}, \text{ или } V_{\text{сух}} = 1/0,395 \cdot D_{750} = 2,53 \cdot D_{750} \quad 1)$$

где D_{750} – оптическая плотность культуры *P. purpureum* на длине волны 750 нм в кювете 0,5 см; $V_{\text{сух}}$ – плотность культуры в фотобиореакторе, г.с.б.:л⁻¹. При измерении оптической плотности кювету устанавливали в максимальной близости к фотоприемнику.

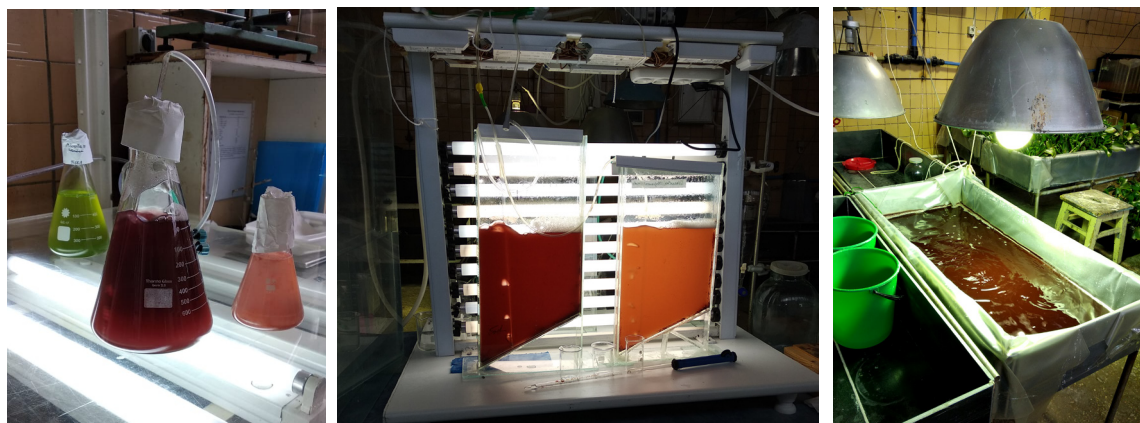


Рисунок 1. Интенсивная культура *Porphyridium purpureum*, выращенная на модифицированной питательной среде Тренкеншу [8] с высоким содержанием гидрокарбоната натрия, без дополнительной подачи CO_2 из баллона

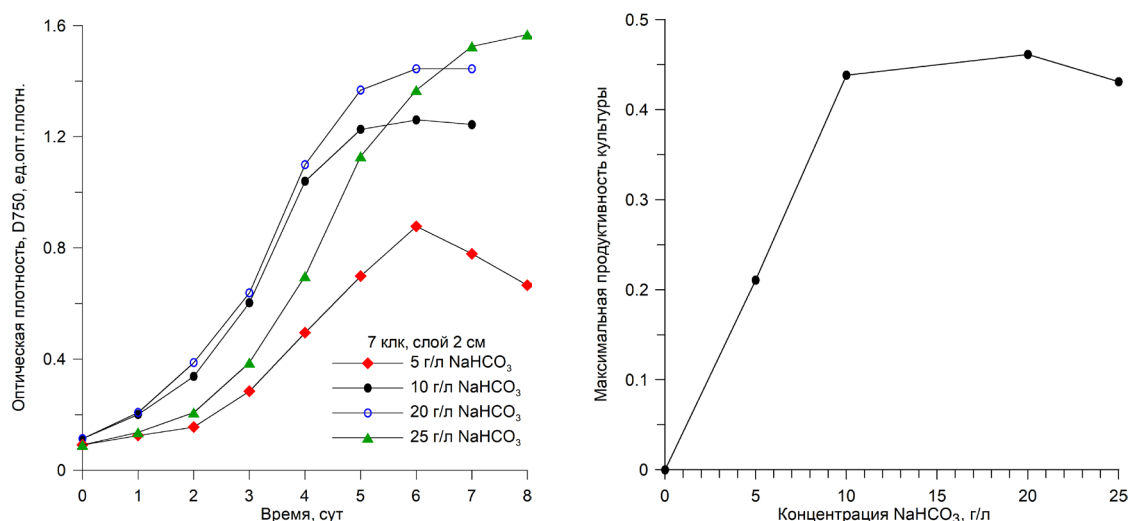


Рисунок 2. Динамика плотности культуры *P. purpureum* в лабораторном фотобиореакторе при различной концентрации гидрокарбоната натрия в питательной среде (слева). Зависимость максимальной продуктивности культуры *P. purpureum* от концентрации лимитирующего субстрата (NaHCO₃) в питательной среде (справа)

Красные микроводоросли в теплице выращивали в осенне-зимний период в 2019-2020 г. Культуру адаптировали к условиям естественного освещения в течение двух суток. Для этой цели инокулят, полученный в лаборатории разбавляли свежей питательной средой в соотношении 1:3 и помещали в промышленный культиватор. Чтобы увеличить рабочий слой суспензии (глубину) и уменьшить освещаемую поверхность на время адаптации один край культиватора приподнимали на 5 см таким образом, чтобы вся суспензия стекала к противоположному краю культиватора. Для исключения гибели неадаптированной культуры от высокого освещения суспензию затенили тканью таким образом, чтобы освещённость рабочей поверхности составляла 7–12 клк. После адаптации культуры выращивали в интенсивном режиме без затенения рабочей поверхности фотобиореактора. По мере нарастания плотности культуры добавляли питательную среду. Адаптированную таким образом суспензию использовали в качестве инокулята для исследования накопительной культуры *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе при естественном освещении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для выполнения поставленной цели были определены оптимальные концентрации источника углерода. После чего модифицирована питательная среда Тренкеншу путем добавления оптимального количества пищевой соды (20 г·л⁻¹). Известно, что растворимость NaHCO₃ в дистиллированной воде при температуре 20°C достигает 95,9 г·л⁻¹. В черноморской воде из-за высокой солёности NaHCO₃ менее растворим. По нашим данным, при той же температуре растворимость достигает 65 г·л⁻¹. Растворение такого количества гидрокарбоната натрия в питательной среде заведомо покрывает потребность в углероде для любых видов водорослей. В случае с *P. purpureum* уже при растворении более 20 г·л⁻¹ NaHCO₃ в питательной среде наблюдалось замедление роста культуры (рис. 2). Кроме того, в присутствии 20 г·л⁻¹ гидрокарбоната натрия в среде растворимость фосфатов уменьшается, поэтому была уменьшена концентрация однозамещённого фосфата натрия до 0,2 г·л⁻¹. При растворении 20 г·л⁻¹ соды в морской воде NaH₂PO₄ · 2H₂O более 0,2 г·л⁻¹ не растворялось.

Модифицированную питательную среду Тренкеншу с высоким содержанием гидрокарбоната натрия использовали для интенсивного культивирования *P. purpureum* как в лабораторном, так и в промышленном фотобиореакторе при искусственном и естественном освещении.

На рисунке 2 представлены накопительные кривые полученные в лабораторном фотобиореакторе и зависимость максимальной продуктивности культуры *P. purpureum* от концентрации гидрокарбоната натрия в питательной среде, из которой видно, что насыщение наступает уже при 10 г·л⁻¹. Однако для достижения максимальной плотности культуры в стационарной фазе роста и максимального увеличения буферности питательного раствора в питательную среду для всех экспериментов была добавлена навеска в два раза больше.

Динамика плотности культуры *P. purpureum* в полупромышленном фотобиореакторе при искусственном и естественном освещении представлена на рисунке 3. В лабораторном фотобиореакторе культура в стационарной фазе роста достигала максимальной плотности $2,53 \cdot 1,44 = 3,64$ г.с.б. · л⁻¹, при этом максимальная продуктивность составила $2,53 \cdot 0,46 = 1,16$ г·л⁻¹ · сут⁻¹. В промышленном фотобиореакторе (70 л) продуктивность была ниже и составляла в среднем за весь период культивирования $2,53 \cdot 0,12 = 0,3$ г·л⁻¹ · сут⁻¹. Следует отметить, что как и в первом, так и во втором случае культура достигала достаточно большой плотности (3 г·л⁻¹ и более). Причем в стационарной фазе роста величина pH среды достигала 9,4 единиц. При таких значениях pH в среде углерод

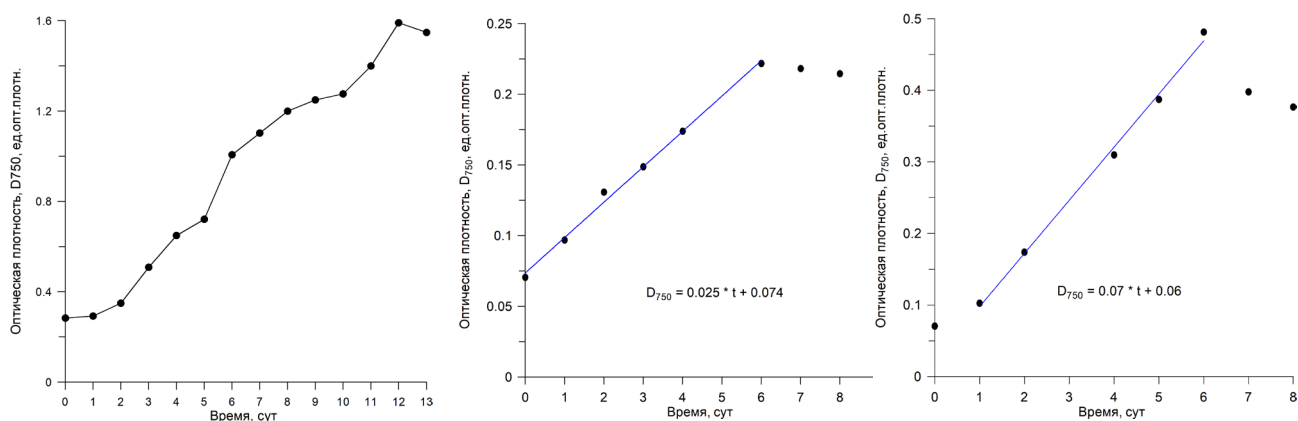


Рисунок 3. Динамика *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе (70 л) при искусственном освещении (слева). Динамика *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе (объем 254 л, глубина 10 см) при естественном освещении в пасмурную погоду с максимальной освещенностью рабочей поверхности в течение дня 7-12 клк (в центре) и в солнечную погоду с максимальной освещенностью рабочей поверхности в течение дня 50 клк (справа)

присутствует только в форме гидрокарбонат-ионов и карбонат-ионов. При дальнейшем увеличении pH, когда в среде преобладают только карбонат-ионы культура *P. purpureum* погибает. Следовательно, культура *P. purpureum* действительно способна поглощать гидрокарбонат-ионы в качестве единственного источника углерода в условиях интенсивного культивирования.

На рисунке 3 представлены накопительные кривые *P. purpureum* в промышленном фотобиореакторе (объем 254 л, глубина 10 см) для условий естественного освещения. В пасмурную погоду (максимальная освещенность рабочей поверхности в течение дня 7-12 клк) продуктивность составила $6,33 \text{ г.с.б.} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. В то время как в солнечную погоду (максимальная освещенность рабочей поверхности в течение дня 50 клк) продуктивность составила $17,7 \text{ г.с.б.} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{сут}^{-1}$. Отметим, при высокой облученности у накопительных кривых не наблюдалось стационарной фазы роста. При достижении максимальной плотности культура переходила в фазу отмирания. Возможно, это связано с высокими значениями pH, при которых многие биогенные элементы становятся недоступными для клеток в связи с малой растворимостью некоторых солей в щелочной среде, а также переходу всех форм неорганического углерода в карбонатную форму.

Таким образом, экспериментально показано, что для интенсивного культивирования *P. purpureum*, как в лабораторных, так и в промышленных масштабах в качестве источника углерода может быть использован гидрокарбонат натрия в концентрациях до $20 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и более.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 121030300149-0.

Список литературы / References:

1. Richmond A., Hu Q. *Handbook of Microalgal Culture Applied Phycology and Biotechnology*. Second Edition, New Delhi, 201, 726 p.
2. Jiao K., Xiao W., Xu Y., Zeng X., Ho S-H., Laws E.A., Lu Y., Ling X., Shi T., Sun Y., Tang X., Lin L. Using a trait-based approach to optimize mixotrophic growth of the red microalga *Porphyridium purpureum* towards fatty acid production. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, vol. 11, iss. 1, pp. 1-11. doi: 10.1186/s13068-018-1277-7
3. Solymosi K. Plastid structure, diversification and interconversions I. *Algae. Current Chemical Biology*, 2012, vol. 6, iss. 3, pp. 167-186. doi: 10.2174/2212796811206030002
4. Kroth P.G. The biodiversity of carbon assimilation. *Journal of Plant Physiology*, 2015, vol. 172, pp. 76-81. doi: 10.1016/j.jplph.2014.07.021
5. Obornik M. Endosymbiotic evolution of algae, secondary heterotrophy and parasitism. *Biomolecules*, 2019, vol. 9, iss. 7, pp. 1-10. doi: 10.3390/biom9070266
6. Velea S., Ilie L., Filipescu L. Optimization of porphyridium purpureum culture growth using two variables experimental design: Light and sodium bicarbonate. *UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science*, 2011, vol. 73, iss. 4, pp. 81-94.
7. Gagnard C., Gargouch N., Dubessay P., Delattre C., Pierre G., Laroche C., Fendri I., Abdelkafi S., Michaud P. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances*, 2019, vol. 37, iss. 1, pp. 193-222. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.014
8. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов микроэлементного питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. *Биология моря*, 1979, № 51, с. 41-46. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. Influence of elements of microelement nutrition on the productivity of *Platymonas viridis* Rouch algae. *Biology of the Sea*, 1979, no. 51, pp. 41-46. (In Russ.)]

9. Li H., Wu Y., Zhao L. Effects of carbon anhydrase on utilization of bicarbonate in microalgae: a case study in Lake Hongfeng. *Acta Geochimica*, 2018, vol. 37, iss. 4, pp. 519-525. doi: 10.1007/s11631-018-0277-4

SODIUM BICARBONATE AS A CARBON SOURCE FOR INTENSIVE CULTIVATION OF *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* (BORY) DREW ET ROSS. ON AN INDUSTRIAL SCALE

Gevorgiz R.G.¹, Uvarov I.P.², Zheleznova S.N.¹

¹ Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the RAS,
Sevastopol, Russia; e-mail: r.gevorgiz@yandex.ru

² Department of Veterinary Medicine of the city of Novosibirsk
Novosibirsk, Russia

Abstract. The paper presents experimental evidence for the use of sodium bicarbonate as the only carbon source during intensive cultivation of *Porphyridium purpureum*. It has been shown that culture media for intensive cultivation of *P. purpureum* based on sea water can contain up to 21 g / l of sodium bicarbonate as a carbon source. When using a nutrient medium with sodium bicarbonate, the maximum density of the culture reached 3 g.b./l and more. The maximum productivity in laboratory photobioreactors reached 1.16 g / (l · day). When *P. purpureum* was cultivated on an industrial scale under natural light, the productivity of the culture depended on light conditions. In cloudy weather, when the maximum illumination during the day was 7-12 klx, the productivity reached 6.33 g.d.b./ (m² day). While in sunny weather (the maximum illumination of the working surface during the day is 50 klx), the productivity was 17.7 g.b./ (m² day). It was noted that at high irradiation, the accumulation curves did not show a stationary growth phase. Upon reaching the maximum density, the culture passed into the phase of withering away. It has been suggested that this is due to high pH values, at which many biogenic elements become inaccessible to cells due to the low solubility of some salts in an alkaline medium, as well as the transition of all forms of inorganic carbon to the carbonate form.

Key words: lower phototrophs, nutrient medium, red microalgae, carbon-concentrating mechanism, baking soda.