

ОЦЕНКА КОЭФФИЦИЕНТА АБСОРБЦИИ УГЛЕРОДА КУЛЬТУРОЙ *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD.

Кальпа В.А.¹, Лелеков А.С.²

¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: faultyradioreceiver@gmail.com

² ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Поступила в редакцию: 23.09.2019

Аннотация. Проведена оценка предельной продуктивности и коэффициента абсорбции углерода культурой *Dunaliella viridis*, выращиваемой при барботаже суспензии с помощью аквариумного распылителя. При условии, что содержание углекислого газа в воздухе составляет 0,04 %, предельная продуктивность культуры микроводорослей составляет 0,622 г СВ/(л·сут), при этом минимальный объем воздуха, который необходимо подать в фотобиореактор для выращивания 1 г биомассы, составляет 2310 л. При увеличении доли углекислого газа в воздухе на 0,01 %, величина предельной продуктивности возрастает в 1,35 раза. Экспериментально показано, что при поверхностной освещенности фотобиореактора 10 клк, скорости продувки воздуха 1 л/л в минуту, коэффициент абсорбции углерода культурой *D. viridis* составляет 18 %, а количество клеток, которое может вырасти на одном грамме углерода – 0,74 млн./мл. Проведена сравнительная оценка коэффициента абсорбции углерода различными видами микроводорослей. Отмечены изменения величины данного параметра у *D. viridis*, *P. purpureum* и *D. salina*, что может быть объяснено не одинаковыми световыми условиями. Определенные в данной работе обобщенные параметры роста микроводорослей могут использоваться при оптимизации их выращивания при различных способах подачи углерода.

Ключевые слова: *Dunaliella viridis*, накопительная культура, максимальная продуктивность, углекислый газ, воздух.

ВВЕДЕНИЕ

Соединения углерода составляют основу земной жизни, а их свойства во многом определяют спектр условий, в которых подобные формы жизни могут существовать. Любой живой организм состоит в значительной степени из углерода. Источником углерода для живых организмов обычно является CO₂ из атмосферы или воды. В результате фотосинтеза он попадает в биологические пищевые цепи, в которых живые существа поедают друг друга или останки друг друга и тем самым добывают углерод для строительства собственного тела. Углерод характеризуется наибольшим из известных количеством аллотропных модификаций: алмаз, графит, лонсдейлит, фуллерен, аморфный углерод, уголь, трехуглерод, сажа. В отношении водорослей выявлена зависимость уменьшения численности и разнообразия в ряду фуллерен - нанотрубки - уголь - графит.

Dunaliella viridis Teod. – широко распространенный, легко культивируемый вид, обитающий в морях и соленых озерах [1]. Как и другие представители рода, является природным источником каротиноидов, глицерина, липидов и многих других биологически активных соединений [2-4]. На скорость роста культуры *D. viridis* влияют многие факторы: световые, температурные условия, степень обеспеченности биогенными элементами. Наряду с азотом и фосфором углерод является наиболее важным элементом в биомассе микроводорослей, содержание которого составляет около 50 % [5]. При культивировании *D. viridis* углерод может подаваться в фотобиореактор тремя способами: 1. С помощью системы брожения (здесь используется спиртовое брожение: дрожжи превращают сахар в спирт и одновременно выделяют CO₂); 2. С помощью баллонов с сжиженным газом (минус в том, что нужно часто менять баллоны с газом и высокая стоимость такого метода); 3. Неоправданно высокий расход углекислоты при выращивании микроводорослей ведёт к удорожанию получаемой биомассы. Выходом из такой ситуации может служить создание благоприятных условий, способствующих растворению углекислого газа, содержащегося в воздухе, в форме, оптимальной для использования клетками микроводорослей (увеличение удельной площади соприкосновения жидкой и газообразной фаз).

Различные режимы подачи углекислоты в жидкую фазу направлены на поддержание оптимальной концентрации углерода в доступной форме в питательной среде. Когда рост культур микроводорослей не ограничен минеральным питанием и светом, недостаток углерода может являться основным лимитирующим фактором. Таким образом, подбор оптимального способа подачи углерода в культуральную среду для *D. viridis* при отсутствии минерального и светового лимитирования является определяющим для интенсивного культивирования данного объекта. Представляется актуальным провести сравнительную оценку предельной продуктивности культур микроводорослей с экспериментально полученными значениями продуктивности при увеличении поверхности соприкосновения фаз «воздух - жидкая среда». Основным параметром, характеризующим интенсивность поглощения углерода микроводорослями, является коэффициент абсорбции [6].

Цель работы: оценить коэффициент абсорбции CO_2 культурой *Dunaliella viridis* и сравнить полученные данные с другими объектами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проводились с культурой зелёной морской микроводоросли *Dunaliella viridis* Teod. из коллекции культур ФИЦ ИнБЮМ. Температуру поддерживали на уровне 24-26°C. Культуру выращивали на питательной среде для морских зелёных микроводорослей [7] в унифицированной установке [8] в лабораторных фотобиореакторах плоскопараллельного типа толщиной 2 см при круглосуточном искусственном освещении люминесцентными лампами Philips, средняя освещённость на поверхности фотобиореактора составляла 10 клк. Барботаж культур осуществляли аквариумным компрессором, скорость подачи воздуха составляла 1 л/л культуры в минуту. Воздух подавался через аквариумный распылитель, представляющий собой пластиковую трубку длиной 5 см, диаметром 5 мм.

Перед отбором проб для определения оптической плотности культуры *D. viridis* объём в фотобиореакторе доводили дистиллированной водой до начального, компенсируя испарение. Температуру суспензии измеряли ртутным термометром непосредственно в фотобиореакторе, абсолютная погрешность измерений составляла 0,5°C. Среднюю освещённость поверхности фотобиореактора определяли люксметром Ю-116 по шести точкам. Отбор проб для определения оптической плотности и числа клеток проводили из разных точек внутри фотобиореактора: отбирали по 0,2 мл суспензии клеток водорослей, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 2 мл. В средней пробе после перемешивания определяли оптическую плотность, производили подсчёт клеток с помощью 4-х сеточной камеры Горяева. Оптическую плотность рассчитывали по формуле:

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

где T – величина пропускания, определяемая на фотометре КФК-2 при длине волны 750 нм, погрешность измерения величины пропускания не превышала 1%.

При определении биомассы (сухого веса) величину оптической плотности умножали на эмпирический коэффициент $k_{D750} = 0,8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{ед.опт.пл.}^{-1}$ [9]. Обработку экспериментальных данных осуществляли в Libre Office и Scidavis.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведём предельную оценку продуктивности культуры морских микроводорослей при использовании в качестве источника углерода CO_2 воздуха, скорость подачи которого составляла 1 л/мин. на 1 л культуры. Учитывая, что объёмная концентрация углекислого газа в атмосферном воздухе составляет около 0,04% [10] объём CO_2 , проходящий через 1 л культуры, составит:

$$V(\text{CO}_2) = 0,4 \text{ мл/мин.}$$

Считая условия нормальными и учитывая молярную массу CO_2 , получим эквивалент по массе углекислого газа, проходящего через 1 л культуры:

$$m(\text{CO}_2) = 0,792 \text{ г/мин.}$$

Рассчитав массовую долю углерода в CO_2 ($w = 0,273$), получим массу углерода в подаваемом воздухе на 1 л культуры в сутки:

$$m(\text{C}) = 0,311 \text{ г/сут.}$$

Считая условия для растворения CO_2 идеальными (углекислый газ полностью переходит в культуральную жидкость) и, считая, что содержание углерода в биомассе микроводорослей составляет 50% [4], получим предельное значение продуктивности с 1 л культуры в сутки:

$$P_{\max} = 0,622 \text{ г/(л} \cdot \text{сут).}$$

Аналогичные расчёты можно провести для определения минимального количества воздуха, необходимого для выращивания 1 грамма биомассы микроводорослей: учитывая, что содержание углерода в биомассе – примерно 50%, следовательно, необходимо подать 0,5 г чистого углерода или, учитывая долю углерода в углекислом газе, 1,83 г CO_2 . Объём CO_2 определим с учётом известной молярной массы для нормальных условий:

$$V(\text{CO}_2) = 0,924 \text{ л.}$$

Таким образом, минимальный объём воздуха, который необходимо подать в фотобиореактор для

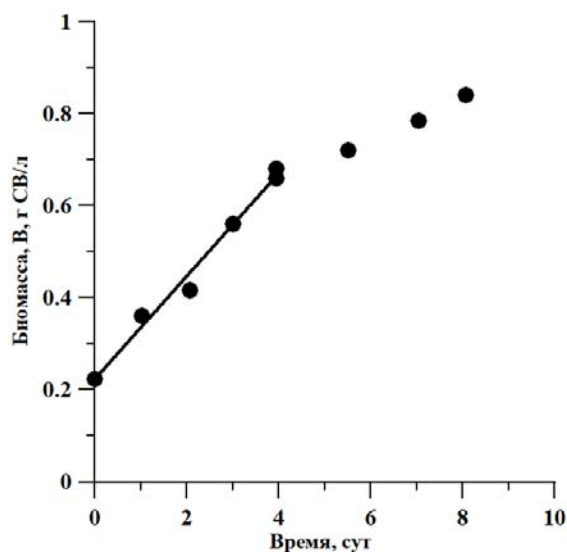


Рисунок 1. Динамика плотности культуры *D. viridis*. Линия – аппроксимация линейной фазы роста уравнением (1) Максимальная скорость роста $P_m = 0,11$ г СВ/(л·сут)

выращивания 1 г биомассы микроводорослей, примерно составляет:

$$V_{\text{возд}} = 0,924 / 0,0004 = 2310 \text{ л.}$$

В предыдущей работе [6] показано, что при содержании CO_2 в воздухе 0,03% максимальная продуктивность составляет 0,46 г/(л·сут), а минимальный объём воздуха для выращивания 1 г биомассы – 3111 л. Таким образом, при увеличении доли CO_2 на 0,01%, продуктивность увеличивается в 1,35 раза, а $V_{\text{воздуха}}$ соответственно уменьшается.

Полученные теоретические значения максимальной продуктивности культур микроводорослей верны только для условий ограничения скорости роста количеством подаваемого углекислого газа, в то время как световые условия и минеральное обеспечение не являются лимитирующими факторами.

Для верификации полученных значений максимальной продуктивности проведён эксперимент по выращиванию *D. viridis* в накопительной культуре. Определим параметр максимальной продуктивности (скорости роста) микроводоросли. Для этого аппроксимируем линейную фазу роста уравнением:

$$B = B_0 + P_m \cdot t, \quad (1)$$

где B_0 – начальная биомасса; P_m – максимальная продуктивность.

Определим параметр максимальной скорости роста *D. viridis* по численности клеток. Для этого аппроксимируем линейную фазу роста кривой по численности клеток уравнением:

$$N = N_0 + \rho_m \cdot t, \quad (2)$$

где N_0 – начальная численность клеток; ρ_m – максимальная продуктивность по численности клеток.

С учётом рассчитанной предельной продуктивности P_{max} , мы можем определить коэффициент абсорбции углерода культурой *D. viridis*:

$$k_A = \frac{0,11 \text{ г СВ}/(\text{л} \cdot \text{сут})}{0,62 \text{ г СВ}/(\text{л} \cdot \text{сут})} \approx 0,18.$$

Полученное значение показывает, что только 18% от подаваемого углерода в форме углекислого газа перешло в биомассу. Также представляет интерес величина, характеризующая максимальный прирост числа клеток *D. viridis* на одном грамме углерода в одном литре культуры:

$$N_A = \frac{0,23 \text{ млн кл.}/(\text{мл} \cdot \text{сут})}{0,31 \text{ г C}/\text{сут}} \approx 0,74 \frac{\text{млн кл.}/\text{мл}}{\text{г C}}.$$

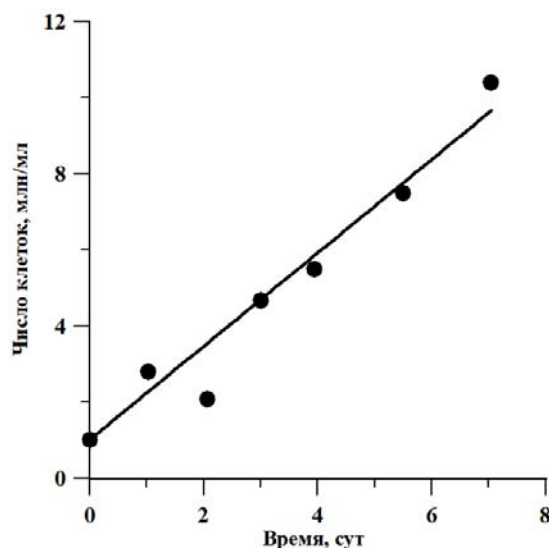


Рисунок 2. Динамика численности клеток *D. viridis*. Линия – аппроксимация линейной фазы роста уравнением (2) Максимальная продуктивность по численности клеток $\rho_m = 0,23$ млн/(мл·сут)

В литературе приводятся данные о величине максимальной продуктивности зелёных и красных видов микроводорослей, культивируемых при барботаже суспензии с помощью аквариумного распылителя. На рисунке 3 представлены накопительные кривые роста *P. purpureum* и *D. salina* по данным работ [6, 11].

В таблице 1 сведены данные о максимальной продуктивности и коэффициенте абсорбции углерода, учитывая, что скорость подачи воздуха составляет 1 л/л в минуту, а предельная продуктивность 0,62 г СВ/(л·сут).

Представленные в таблице 1 значения показывают значительные различия между величиной коэффициента абсорбции углерода, полученного в данной работе и определённого по литературным данным. Конечно, данный параметр априори не может составлять 100%, так как часть подаваемого в культиватор углекислого газа не будет поглощена клетками. Поглощение микроводорослями углерода из внешней среды является сложным процессом. Температура, рН среды в первую очередь определяют растворимость газов в жидкой среде. Отметим, что во всех экспериментах для указанных в таблице 1 видов температура и рН были примерно одинаковыми и составляли 26-28°C и 8-9 единиц рС и 8-9 единиц рН соответственно.

Различия значений максимальной продуктивности и коэффициента абсорбции могут быть объяснены неодинаковыми световыми условиями экспериментов. Так в эксперименте с *D. salina* [11] поверхностная освещённость культиватора составляла 15 клк, а в эксперименте с *P. purpureum* [6] – 13 клк. Известно, что именно световые условия оказывают первостепенное влияние на рост микроводорослей в целом, а также на скорость многих ферментативных процессов, в частности на скорость фиксации и преобразования углекислого газа.

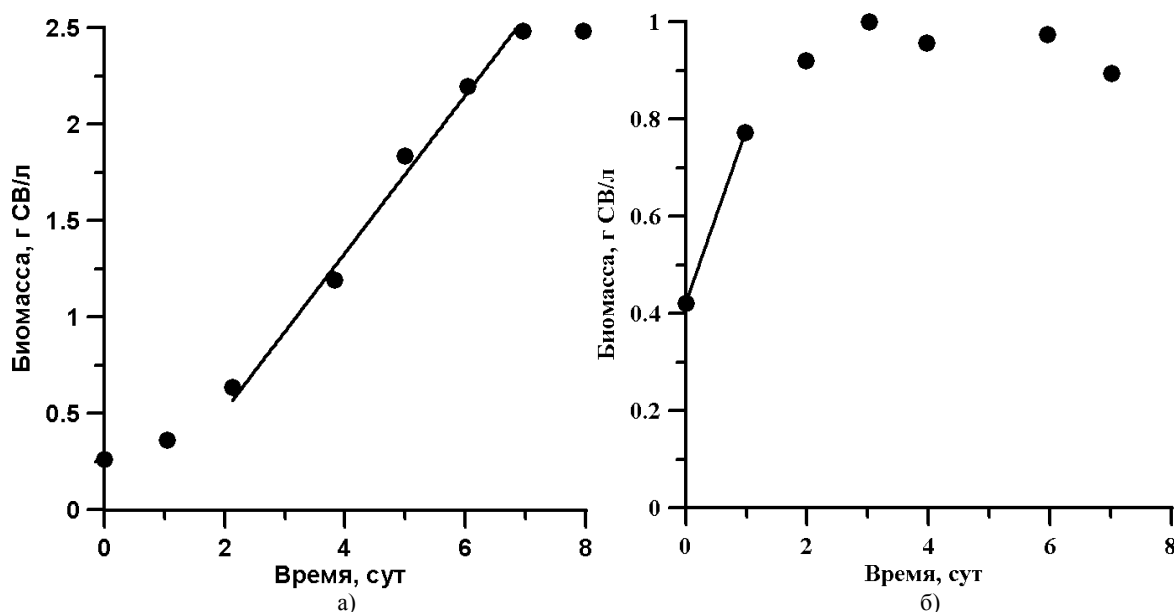


Рисунок 3. Накопительные кривые роста *P. purpureum* [6] (а) и *D. salina* [11] (б). Линия – аппроксимация экспериментальных данных линейным уравнением, максимальная продуктивность $P_m = 0,39$ г СВ/л·сут и 0,34 г СВ/л·сут соответственно

Таблица 1. Максимальная продуктивность и коэффициент абсорбции углерода различными видами микроводорослей, культивируемых при барботаже суспензии с помощью аквариумного распылителя

	P_m , г СВ/(л·сут)	k_A , %
<i>D. viridis</i>	0,11	18
<i>D. salina</i> (Гудвилевич)	0,34	55
<i>P. purpureum</i> (Лелеков)	0,31	50

Например, исследования CO_2 -концентрирующего механизма зелёных видов микроводорослей, показали, что АТФ обеспечивает энергией транспорт углерода внутри клеток, который осуществляется против градиента его концентрации [12]. Для окисленных фотоавтотрофов АТФ образуется преимущественно в световых реакциях фотосинтеза, таким образом, свет оказывает влияние не только на скорость преобразования углекислого газа в первичные углеводы, но и на скорость транспорта углерода. Таким образом, рост культуры *D. viridis* в данном эксперименте мог быть лимитирован световыми условиями, так как поверхностная освещённость составляла 10 клк.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопросы обеспеченности клеток микроводорослей биогенными элементами имеют первостепенное значение не только в научных исследованиях, но и промышленном культивировании. Так как углерод составляет половину сухой биомассы, то потребность микроводорослей в углероде максимальна по сравнению с другими элементами. Использование углекислого газа воздуха представляется наименее затратным способом обеспечения клеток углеродом. На сегодняшний день работы в данном направлении идут по пути увеличения количества воздуха, прокачиваемого через суспензию микроводорослей [13], либо по увеличению площади соприкосновения фаз «воздух - жидкая среда». В данной работе определены обобщённые параметры роста культуры микроводорослей, которые могут использоваться для оптимизации выращивания микроводорослей при различных способах подачи углерода. Параметр максимальной продуктивности культуры является идеализацией представлений о субстратзависимом росте, тем не менее, необходим для предельной оценки системы культивирования микроводорослей. Коэффициент абсорбции, показывающий долю поглощённого углерода, при прочих заданных внешних условиях, позволяет судить не только о технической реализации системы культивирования, но и о внутриклеточной организации CO_2 -концентрирующего механизма. Анализ литературных данных о механизмах поглощения неорганических форм углерода клетками микроводорослей показал, что организация CO_2 -концентрирующего механизма (ССМ) у различных систематических групп различная. Кроме того, на кинетику процесса поглощения оказывает влияние величина облучённости клеток. Тем не менее, коэффициент абсорбции можно рассматривать как обобщённый показатель организации ССМ микроводорослей.

Работа выполнена в рамках госзадания по теме НИР ФИЦ ИнБЮМ № 0828-2019-0004.

Список литературы / References:

1. Боровков А.Б. Зелёная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (обзор). *Экология моря*, 2005, т. 67, с. 5-17. [Borovkov A.B. Green microalga *Dunaliella salina* Teod. (review). *Ecologiya morya*, 2005, vol. 67, pp. 5-17. (In Russ.)]
2. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod.* Киев: Наукова думка, 1973, 487 с. [Masuk N.P. *Morphology, systematics, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod.* Kyev: Naukova dumka, 1973, 487 p. (In Russ.)]
3. Oren A. A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005. *Saline Systems*, 2005, URL: <http://www.salinesystems.org/content/1/1/2>. DOI: 10.1186/1746-1448-1-2.
4. Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M. Mode of action of the massively accumulated, β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol*, 1989, vol. 91, no. 3, pp. 1040-1043.
5. Кожемяка А.Б. Зависимость концентрации органического вещества в клетке от её объёма для черномоских видов *Bacillariophyta*. *Морской экологический журнал*, 2014, т. 8, № 1, с. 35-43. [Kozhemyaka A.B. The dependence of the concentration of organic matter in the cell on its volume for the Black Sea species of *Bacillariophyta*, *Morskoy ekologicheskiy zhurnal*, 2014, vol. 8, no. 1, pp. 35-43. (In Russ.)]
6. Лелеков А.С., Гудвилевич И.Н., Геворгиз Р.Г., Тренкеншу Р.П., Бадисова А.О. Оценка коэффициента абсорбции углерода культурой *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. *Сборник материалов Всерос. науч.-практ. конф. к 145-летию Севастопольской биологической станции (Севастополь, 19-24 сент. 2016 г.)*. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2016, т. 3, с. 404-407. [Lelekov A.S., Gudvilovich I.N., Gevorgiz R.G., Trenkenshu R.P., Badisova A.O. Estimation of carbon absorption coefficient by *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross culture. *Collection of materials Vseros. scientific-practical conf. to the 145th anniversary of the Sevastopol Biological Station (Sevastopol, September 19-24, 2016)*. Sevastopol: ECOSI-Hydrophysics, 2016, vol. 3, pp. 404-407. (In Russ.)]
7. Тренкеншу Р.П., Беянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли

Platymonas viridis. *Биология моря*, 1979, т. 51, с. 41-46. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. The effect of mineral nutrients on the productivity of the alga *Platymonas viridis*. *Biologiya morya*, 1979, vol. 51, pp. 41-46. (In Russ.)]

8. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С., Боровков А.Б., Новикова Т.М. Унифицированная установка для лабораторных исследований микроводорослей. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13), URL: <http://algology.ru/1097> [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. The unified installation for laboratory research of microalgae. *Issues of modern algology*, 2017, no. 1 (13), URL: <http://algology.ru/1097> (In Russ.)]

9. Меметшаева О.А. Репродуктивная активность клеток *Dunaliella viridis* Teod. при разном углеродном обеспечении в накопительной культуре. *Вопросы современной альгологии*, 2018, № 3 (18), URL: <http://algology.ru/1369> [Memetshaeva O.A. Reproductive activity of *Dunaliella viridis* Teod cells. with different carbon supply in the funded culture. *Issues of modern algology*, 2018, no. 3 (18), URL: <http://algology.ru/1369> (In Russ.)]

10. Doney S.C., Fabry V.J., Feely R.A., Kleypas J.A. Ocean Acidification: the other CO₂ problem. *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 2009, vol. 1, pp. 169-192.

11. Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б. Продуктивность микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. при различных способах внесения углекислого газа в культуру. *Морской биологический журнал*, 2017, т. 2, № 2. с. 34-40. DOI: 10.21072/mbj.2017.02.2.03. [Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. Microalgae productivity *Dunaliella salina* Teod. with various methods of introducing carbon dioxide into the culture. *Morskoy ekologicheskiy zhurnal*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 34-40. DOI: 10.21072/mbj.2017.02.2.03. (In Russ.)]

12. 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. Organization and physiological role of the CO₂-concentrating mechanism in microalgae photosynthesis. *Fiziologiya rasteniy*, 2000, vol. 47, no. 5, pp. 801-810. (In Russ.)]

13. Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Зозуля Ю.В., Уваров И.П., Лелеков А.С., Нехорошев М.В. Промышленная технология производства фукоксантина на основе интенсивной культуры морской диатомеи *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin в газовихревом фотобиореакторе. *Российский биотерапевтический журнал*, 2016, т. 15, № 1, с. 22. [Gevorgiz R.G., Zheleznova S.N., Zozulya U.V., Uvarov I.P., Lelekov A.S., Nekhoroshev M.N. Industrial technology for the production of fucoxanthin based on the intensive culture of the marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Ehrenberg) Reimann & Lewin in a gas-vortex photobioreactor. *Russian Journal of Biotherapy*, 2016, vol. 14, no. 1, p. 22. (In Russ.)]

EVALUATION OF THE CARBON ABSORPTION COEFFICIENT OF *DUNALIELLA VIRIDIS* TEOD.

Kalpa V.A.¹, Lelekov A.S.²

¹ Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: faultyradioreceiver@gmail.com

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS

Nakhimova Av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: a.lelekov@yandex.ru

Abstract. The estimation of limit productivity and coefficient of carbon absorption by *Dunaliella viridis* culture grown during bubbling of suspension with the help of aquarium spray was carried out. Provided that the content of carbon dioxide in the air is 0.04 %, the limit productivity of the culture of microalgae is 0.622 g SV/(l-day), while the minimum volume of air that must be fed to the photobioreactor for growing 1 g of biomass is 2310 L. With an increase in the proportion of carbon dioxide in the air by 0.01%, the value of the limit productivity increases by 1.35 times. It was experimentally shown that at the surface illumination of a photobioreactor of 10 klx, the air purge rate of 1 l / l per minute, the absorption carbon coefficient of *D. viridis* culture is 18 %, and the number of cells that can grow on one gram of carbon is 0.74 million/ml. A comparative assessment of the absorption carbon coefficient of different types of microalgae was carried out. Changes in the value of this parameter were observed in *D. viridis*, *P. purpureum* and *D. salina*, which can be explained by different light conditions. The generalized parameters of microalgae growth defined in this paper can be used to optimize their cultivation with different methods of carbon supply.

Key words: *Dunaliella viridis*, storage culture, maximum productivity, carbon dioxide, air.