

ПРОДУКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* В УСЛОВИЯХ ЕСТЕСТВЕННОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Чекушкин А.А., Лелеков А.С.

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»
пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

Поступила в редакцию: 02.08.2021

Аннотация. В работе исследован рост накопительной культуры *Phaeodactylum tricornutum* в условиях естественного освещения. Эксперимент проводился в районе города Севастополя в горизонтальном фотобиореакторе в зимний период. Все внешние факторы (температура, pH, количество биогенных элементов питательной среды) находились в оптимальном для данного вида диапазоне. Единственной вариабельной величиной являлся приток солнечной радиации. В эксперименте определяли изменения биомассы феодактилума и притока солнечной радиации в течение девяти суток. Показано, что средняя скорость роста составила $2,37 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ сут}^{-1}$, а прирост плотности *Ph. tricornutum* за световой день – $4 - 8 \text{ г СВ/м}^2$. Величина ночной потери биомассы в среднем равнялась 18 % от текущей биомассы, а потери от дневного прироста достигали 100 %. Сравнение полученных значений с литературными данными показало, величина продуктивности определяется притоком солнечной радиации в области ФАР для данной географической широты. Величина суточного прироста культуры и ночные потери биомассы определяются её биохимическим составом.

Ключевые слова: микроводоросли, приток солнечной радиации, ночная потеря биомассы.

Диатомовые водоросли обеспечивают до 25 % первичной продукции мирового океана, а их биомасса является самой большой среди микроводорослей [1]. Среди множества диатомовых видов микроводорослей лишь немногие культивируют в промышленных масштабах. Для получения биологически активных веществ необходимо подобрать такой вид, который бы обладал высокими скоростями роста и высокой продукцией требуемых биохимических компонентов. Этим требованиям отвечает морская диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricornutum*. Клетки *Ph. tricornutum* содержат каротиноиды, полиненасыщенные жирные кислоты, данный вид также используется в кормах для животных и аквакультуре [2,3]. Особое внимание заслуживает эйкозапентаеновая кислота [4,5] и уникальный каротиноид фукоксантин, на основе которого созданы препараты для лечения раковых заболеваний [6]. В последнее время *Ph. tricornutum* был включен в число потенциальных объектов для производства биодизельного топлива [7].

В промышленных масштабах микроводоросли, как правило, выращивают в открытых фотобиореакторах в условиях естественного освещения, что обуславливает суточную ритмику роста и биосинтеза. В литературе имеются публикации, в которых сообщается о подборе питательных сред для выращивания *Ph. tricornutum*, исследуется влияние факторов среды на рост, рассматриваются способы проточного культивирования [6, 8, 9]. Температурный оптимум скорости роста *Ph. tricornutum* находится при 20 °C [10], поэтому привлекательной является идея разработки технологии производства биомассы *Ph. tricornutum* в культиваторах открытого типа (бассейнах) в зимний период в южных регионах России. Юг России, благодаря высокому притоку солнечной радиации [11], является самым перспективным регионом для производства биомассы различных видов микроводорослей, которая может быть использована при решении задачи оздоровления населения, повышения эффективности сельского хозяйства путем альголизации почв, утилизации сельскохозяйственных и городских сточных вод и др. Так как световые условия являются наиболее значимым фактором, определяющими скорость роста культуры микроводорослей, необходимо оценить влияние солнечной радиации на продукционные характеристики *Ph. tricornutum*. Поэтому исследование суточной динамики изменения биомассы в осенне – весенний период является первым этапом при разработке теоретических основ роста культуры *Ph. tricornutum* в условиях естественного освещения.

Цель данной работы – определение продуктивности накопительной культуры *Ph. tricornutum* при её полупромышленном выращивании на юго-западе Крымского полуострова (г. Севастополь).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальные работы выполнялись на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского» с 25 января по 02 февраля 2021 г. Культивирование *Ph. tricornutum* осуществлялось в условиях естественного освещения в альгобиотехнологическом модуле, расположенном в г. Севастополь на территории радиобиологического корпуса ФИЦ ИнБЮМ. Модуль выполнен на базе многоцелевой оцинкованной конструкции «Урожай-Абсолют», покрытой сотовым поликарбонатом 4 мм. Размеры модуля 4 м на 3 м, высота в верхней точке арки 2,5 м. Модуль оборудован двумя дверными проёмами с обоих торцов, в верхней части которых находятся форточки. По центру выполнен технологический проход шириной 1 м, по обеим сторонам которого находятся прямоугольные бассейны. Модуль электрифицирован 220 В, подведена морская и пресная вода. Каркас каждого бассейна изготовлен из необрезной доски шириной 150 мм, бассейны выстелены полиэтиленовой плёнкой. Перемешивание культуры микроводорослей

осуществлялось аквариумной помпой Barbus pump 001 (400 л/ч). Модуль оснащён баллоном с углекислотой, которая необходима для нормального роста и развития водорослей [12].

Культуру диатомовой микроводоросли *Ph. tricorutum* Bohlin (штамм IBSS-41 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана») выращивали в накопительном режиме на питательной среде для морских микроводорослей [13] в плоскопараллельном бассейне. Объём бассейна составлял 15,5 л, толщина слоя суспензии 6,5 см, площадь освещаемой поверхности – 0,24 м². Для определения количества солнечной энергии ФАР использовали автоматический датчик измерения освещённости на базе платформы Arduino [14]. Величины освещённости (клк) переводили в облучённость ФАР (Вт/м²), приходящуюся на поверхность бассейна, с помощью коэффициента 4,26 [15]. Для сравнения полученных значений энергии ФАР с литературными данными, величины световой энергии переводили в микромоли квантов на единицу площади в единицу времени. Для этого определяли долю световой энергии, приходящуюся на каждую длину волны в области ФАР. Далее рассчитывали количество энергии для каждой длины волны, с учётом энергии одного кванта определяли число квантов на каждой длине волны. Окончательно, находили суммарное количество квантов, полученное значение делили на число Авогадро. С учётом спектра солнца для зимнего периода и географической широты г. Севастополя [15], для перевода единиц освещённости (клк) в единицы интенсивности света (мкмоль·м⁻²·с⁻¹) необходимо использовать коэффициент 23,51.

Биомассу микроводоросли *Ph. tricorutum* определяли оптическим методом и методом прямого взвешивания с центрифужных пробирках. Отбор проб проводили из разных точек бассейна: отбирали по 20 мл суспензии клеток, получая таким образом «среднюю пробу» объёмом 100 мл. Среднюю пробу перемешивали и определяли величину оптической плотности на фотометре UNICO-2100 при длине волны 750 нм, относительная погрешность измерения не превышала 1 % пропускания. Измерения проводили относительно дистиллированной воды. При выходе показаний прибора за границы рабочего диапазона (ниже 30 % пропускания), проба разбавлялась дистиллированной водой. Для определения сухого веса из средней пробы отбирали 10 мл суспензии в полипропиленовые пробирки, доведённые до постоянного веса, осаждали при 3000 об./мин на центрифуге ОПН – 3, сливали надосадочную жидкость, промывали дистиллированной водой и высушивали при 60°C. Полученный коэффициент для пересчёта единиц оптической плотности D_{750} в биомассу (г СВ/л) составил 0,55 (рис. 1).

Температуру и pH суспензии поддерживали в оптимальном диапазоне [10]. Температуру стабилизировали на уровне 22 ± 1 °C с помощью аквариумного обогревателя Atman AT-50W. pH культуры поддерживали в диапазоне 9 – 9,5 путём подачи углекислого газа непосредственно в бассейн с культурой. Толщина слоя культуры составляла 6,5 см.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Начальная плотность культуры *Ph. tricorutum* составляла 0,06 г СВ/л или 3,57 г СВ/м² (рис. 2 А). За 9 суток культивирования прирост биомассы *Ph. tricorutum* составил около 0,43 г СВ/л или 27,89 г СВ/м². Таким образом, суммарный прирост составил 24,32 г СВ в расчёте на квадратный метр освещаемой поверхности. Отметим, что рост плотности культуры характеризовался сильной нелинейностью, которая обусловлена изменяющимися световыми условиями. Так в течение светового дня наблюдался рост биомассы, однако ночью отмечалось значительное её уменьшение.

Определим продуктивность культуры за световой день и её среднее значение за всё время эксперимента. Для расчёта продуктивности использовали выражение [12]:

$$B = B_l + P_m (t - t_l) \quad (1)$$

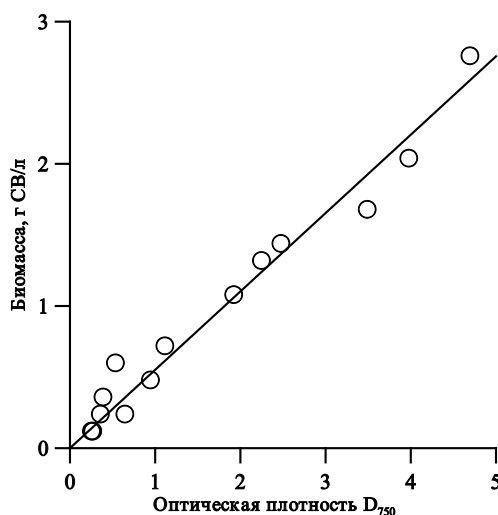


Рисунок 1. Линейная зависимость биомассы *Ph. tricorutum* от оптической плотности D_{750}

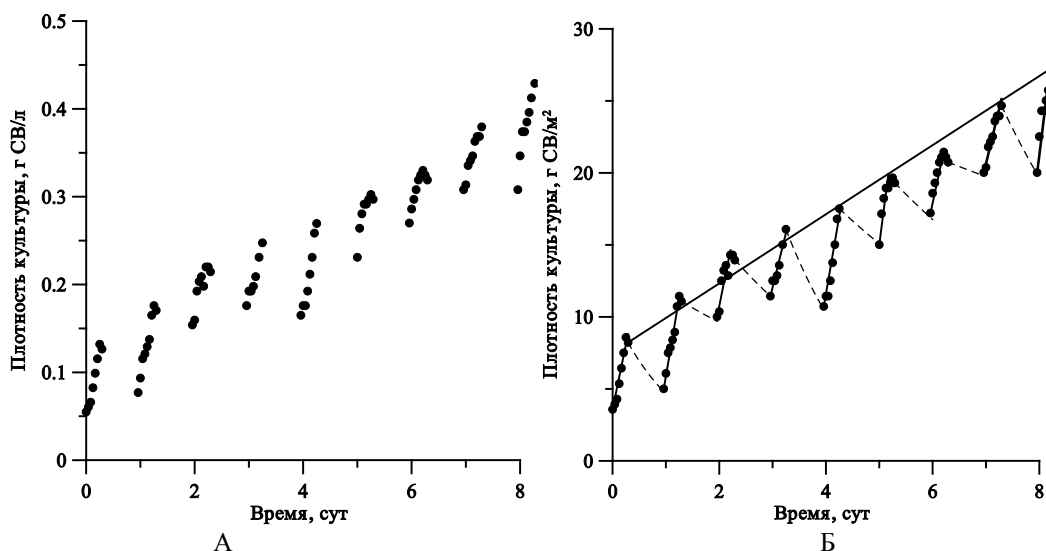


Рисунок 2. А – Динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricornutum*. Б – Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (1) за каждый световой день и за всё время эксперимента

где B – текущая биомасса, измеряемая в данный момент времени t , B_1 – биомасса в моменте начала линейной фазы роста t_1 , P_m – продуктивность (скорость роста).

Например, аппроксимация экспериментальных данных выражением (1) позволила определить среднюю скорость роста для всей накопительной кривой. Для расчёта использовали максимальные значения плотности культуры каждого светового дня (см. рис. 2 Б). Полученное выражение имеет вид:

$$B = 8,22 + 2,27 (t - 0,29) \tag{2}$$

На рисунке 3 представлена динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricornutum* и изменение поверхностной облучённости бассейна за световой день (28 января 2021 г). Отметим, что рост плотности культуры за 8 часов светового дня с высокой точностью ($R^2=0,96$) описывается выражением (1):

$$B = 11,44 + 0,62 (t - 9) \tag{3}$$

Значение продуктивности культуры *Ph. tricornutum* за световой день составило $0,62 \text{ г СВ м}^{-2} \text{ ч}^{-1}$. В таблице 1 представлены величины прироста плотности культуры *Ph. tricornutum* за каждый световой день эксперимента, а также суммарная энергия ФАР, приходящаяся на поверхность фотобиореактора. Отметим, что продолжительность светового дня составляла 8 часов, при этом рост феодактилума регистрировали в течение 7 часов, потому что утренние и вечерние часы наблюдалось затенение бассейна. Средний прирост биомассы за световой день составлял $4\text{--}8 \text{ г СВ/м}^2$, а количество световой энергии – $0,5\text{--}0,7 \text{ МДж/м}^2$.

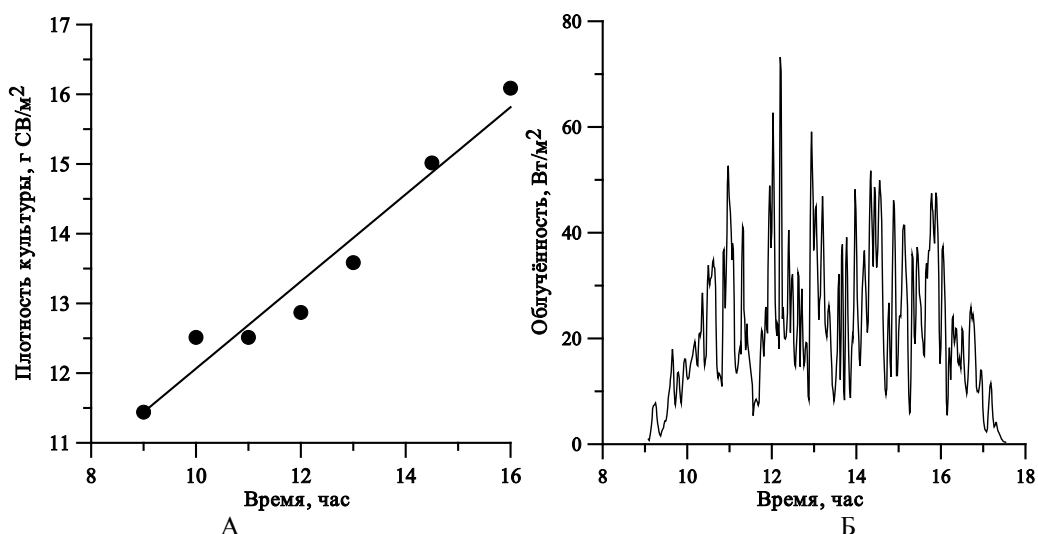


Рисунок 3. А – Динамика плотности накопительной культуры *Ph. tricornutum* 28 января 2021 г. Б – Изменение поверхностной облучённости бассейна в течение светового дня

Таблица 1. Прирост биомассы *Ph. tricornutum* за световой день, ночная потеря биомассы и суммарная энергия ФАР, приходящаяся на поверхность фотобиореактора в эксперименте

Дата	P , г СВ/м ²	НПБ, %	НПБ, % от прироста за световой день	E , МДж/м ²
25.01.2021	5,24	–	–	0,66
26.01.2021	6,37	40	40	0,61
27.01.2021	5,38	10	17	0,53
28.01.2021	4,41	18	46	0,59
29.01.2021	6,30	33	121	0,48
30.01.2021	8,41	14	40	0,95
31.01.2021	5,04	11	25	0,89
01.02.2021	4,50	4	14	0,95
02.02.2021	8,79	19	103	0,62

По литературным данным известно, что в летний период продуктивность накопительной культуры *Ph. tricornutum* в открытых бассейнах составляет около 14 г СВ/м² в сутки [1]. В нашем эксперименте в зимний период среднее значение продуктивности составило 2,37 г СВ/м² в сутки, а максимальный прирост за световой день – 8,79 г СВ/м² (рис. 2 Б). Так как используемая питательная среда рассчитана на 4 г СВ/л [12], а плотность культуры в эксперименте не превышала 0,4 г СВ/л (рис. 1 А), то клетки *Ph. tricornutum* не испытывали недостатка в биогенных элементах. Кроме того, температуру и pH культуральной среды поддерживали в оптимальном диапазоне для *Ph. tricornutum*. Следовательно, скорость роста зависела от количества поглощённой энергии. На рисунке 3 представлена динамика изменения облучённости на поверхности фотобиореактора. Среднее количество энергии ФАР, приходящееся на поверхность бассейна, было в 2 – 3 раза меньше значений, характерных для данного региона [11]. Это связано с тем, что часть света поглощалась или отражалась от поверхности альгобиотехнологического модуля.

Сравним полученные значения облучённости с данными работы [1], в которой *Ph. tricornutum* выращивался в летний период на той же географической широте (44° N). Известно, что облучённость горизонтального фотобиореактора на этой широте в июле больше, чем в январе примерно в три раза [11]. Поэтому можно предположить, что среднее значение продуктивности культуры составит 14 г СВ м⁻² сут⁻¹ / 3 = 4,6 г СВ м⁻² сут⁻¹. Полученное значение практически в два раза выше, чем продуктивность *Ph. tricornutum* в нашем эксперименте, которая составила 2,37 г СВ м⁻² сут⁻¹. Разница объясняется тем, что наш фотобиореактор находился в альгобиотехнологическом модуле, материал которого отражал и поглощал до 50 % падающего солнечного света.

Особый интерес представляет продуктивность феодактилума за световой день, которая в 2-4 раза выше, чем средние суточные значения и составляет 4 – 8 г СВ м⁻². Продуктивность культуры за световой день не уменьшается за счёт ночных потерь биомассы (НПБ), которые в среднем составляли 18 % от текущей плотности культуры (табл. 1). По литературным данным известно, что НПБ накопительной культуры *Arthrospira platensis* в лабораторных условиях составляла около 8 % от величины биомассы в начале темного периода [16]. Такие значения НПБ отмечены при культивировании спирулины и в условиях естественного освещения в летний период, однако НПБ от величины дневного прироста равнялась 35 % [17]. Для схожих световых условий НПБ накопительной культуры *Ph. tricornutum* составляла 17 % от дневного прироста [1]. Этот результат получен в летний период, когда продолжительность светового дня – 12 часов, в то время как в данном эксперименте в январе продолжительность светового дня составляла около 7 часов. По нашим расчётам НПБ от величины

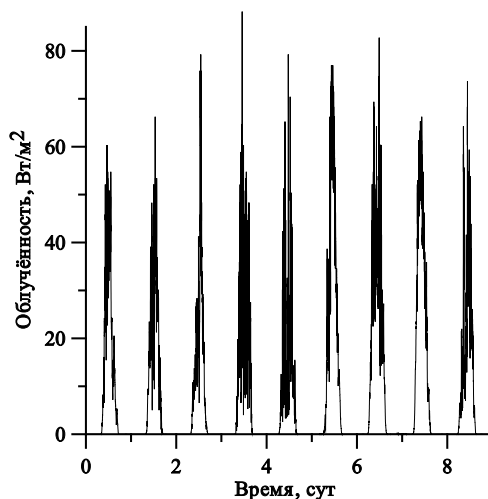


Рисунок 4. Изменение облучённости горизонтального фотобиореактора с 25 января по 1 февраля

дневного прироста варьировала от 14 до 121 %. В целом она не зависела ни от температуры суспензии, ни от притока солнечной радиации. Анализ литературных источников показывает, что в ночные часы происходят значительные изменения биохимического состава микроводорослей [16-18]. Известно, что число клеток *Ph. triornutum*, общий органический углерод и азот увеличивались в ночное время, при этом глюкоза и триацилглицерины уменьшались в абсолютных величинах [18]. Кроме того, по данным цитируемой работы число клеток феодактилума первые шесть часов после восхода не изменялось несмотря на то, что облучённость фотобиореактора была в 5-7 раз выше, по сравнению с нашими данными. Таким образом, величина НПБ зависит от биохимического состава биомассы, физиологического состояния клеток культуры и пр. Световой режим в которой находится культура влияет на продукционные характеристики *Ph. triornutum* не на прямую, а через изменение продукции того или иного биохимического компонента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определены продукционные характеристики накопительной культуры *Ph. triornutum* при её выращивании в зимний период. Неблагоприятные световые условия значительно ограничивают продуктивность феодактилума, которая в среднем составила 2,37 г СВ м⁻² сут⁻¹. Показано, что данная величина определяется количеством поглощенной световой энергии и биохимическим составом культуры. В накопительном режиме выращивания наблюдаются значительные потери биомассы в ночное время, которые достигают 100 % от величины дневного прироста. Поэтому при организации промышленного производства *Ph. triornutum* необходимо учитывать продолжительность светового дня, средний приток солнечной радиации для конкретной географической широты, а также определить кинетические коэффициенты изменения содержания макромолекулярных компонентов биомассы. Для достижения последнего необходимы системы автоматического контроля числа клеток, биомассы, общего белка, углеводов, липидов.

Список литературы / References:

1. Benavides A.M.S., Torzillo G., Kopecky J., Masojídek J. Productivity and biochemical composition of *Phaeodactylum triornutum* (Bacillariophyceae) cultures grown outdoors in tubular photobioreactors and open ponds. *Biomass and Bioenergy*, 2013, vol. 54, pp. 115-122. doi: 10.1016/2013.03.016
2. Lebeau T., Jean-Michel R.L. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part I: cultivation at various scales. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 60, no. 6, pp. 612-623. doi: 10.1007/s00253-002-1176-4
3. Lebeau T., Jean-Michel R.L. Diatom cultivation and biotechnologically relevant products. Part II: current and putative products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, vol. 60, no. 6, pp. 624-32. doi: 10.1007/s00253-002-1177-3
4. Kikuchi M., Hirano A., Kunito Sh., Kawakami Y. Fucoxanthin, an antioxidative substance from marine diatom *Phaeodactylum triornutum*. *Journal of Marine Biotechnology*, 1995, vol. 3, no. 1, pp. 132-135.
5. Kim S.M., Jung Y.-J., Kwon Oh.-N., Cha K.H., Um B.-H., Chung D., Pan Ch.-H. A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum triornutum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, vol. 166, no. 7, pp. 1843-1855. doi: 10.1007/s12010-012-9602-2
6. Alonso D.L., Belarbi E.H., Fernandez S.J., Rodriguez-Ruiz J., Grima M.E. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum triornutum*. *Phytochemistry*, 2000, vol. 54, no. 5, pp. 461-471.
7. Mata T.M., Martins A.A., Caetano N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, vol. 14, pp. 217-232. doi: 10.1016/2009.07.020
8. Kudo I., Miyamoto M., Noiri Y., Maita Y. Combined effects of temperature and iron on the growth and physiology of the marine diatom *Phaeodactylum triornutum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 2000, vol. 36, no. 6, pp. 1096-1102.
9. Okay O.S., Gaines A., Davie A.M. The Growth of Continuous Cultures of the Phytoplankton *Phaeodactylum Triornutum*. *Turkish J. Eng. Env. Sci*, 2003, vol. 27, pp. 145-155.
10. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, 481 p.
11. *Справочник по климату СССР. Вып. 10. Украинская ССР. Часть 1. Солнечная радиация, радиационный баланс и солнечное сияние*. Л.: Гидрометиздат, 1966, 124 с. [*Handbook on climate USSR. Issue 10. Ukrainian SSR. Part 1. Solar radiation, radiation balance and solar radiance*. L.: Gidrometizdat, 1966, 124 p. (In Russ.)]
12. Тренкеншу Р.П., Лелеков А.С. Моделирование роста микроводорослей в культуре. Севастополь: ООО "Константа-Принт", 2017, 152 с. [Trenkenshu R.P., Lelekov A.S. Modeling of microalgae growth in culture. Sevastopol-OOO "Konstanta-Print", 2007, 152 p. (In Russ.)]
13. Тренкеншу Р.П., Терсков И.А., Сидько Ф.Я. Плотные культуры морских микроводорослей. *Изв. СО АН СССР (сер. Биол.)*, 1981. № 15, вып. 3, с. 75-82. [Trenkenshu R.P., Terskov. I.A., Sidko F.Ya. Dense cultures of marine microalgae. *Izv. SO ANSSSR (ser. Biol.)*, 1981, no. 15, vol. 3, pp. 75-82. (In Russ.)]
14. Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Тренкеншу Р.П. Моделирование суточных колебаний освещённости в районе г. Севастополя. *Актуальные вопросы биологической химии и физики*, 2018, т. 3, № 3, с. 547-552.

[Chekushkin A.A., Lelekov A.S., Trenkenshu R.P. Modeling of daily fluctuations of illumination in the area of Sevastopol. *Actual problems of biological chemistry and physics*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 547-552. (In Russ.)]

15. Чекушкин А.А., Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г. Сезонная динамика предельной продуктивности в горизонтальном фотобиореакторе. *Актуальные вопросы биологической химии и физики*, 2020, т. 3, № 3, с. 405-412. [Chekushkin A.A., Lelekov A.S., Gevorgiz R.G. Seasonal dynamics of productivity in horizontal photobiosynthesis. *Actual problems of biological chemistry and physics*, 2020, vol. 3, no. 3, pp. 405-412. (In Russ.)]

16. Авсиян А.Л. Динамика потери биомассы в культуре *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanoprokaryota) в темновых условиях. *Альгология*, 2014, т. 24, № 3, с. 417-420. [Avsiyan A.L. Dynamics of biomass loss in the culture of *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler (Cyanoprokaryota) under dark conditions. *Algology*, 2014, vol. 24, no. 3, pp. 417-420. (In Russ.)]

17. Torzillo G., Sacchi A., Materassi R. et al. Effect of temperature on yield and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Journal Applied Phycology*, 1991, vol. 3, pp. 103-109.

18. Jallet D., Caballero M.A., Gallina A.A., Youngblood M., Peers G. Photosynthetic physiology and biomass partitioning in the model diatom *Phaeodactylum tricornerutum* grown in a sinusoidal light regime. *Algal Research*, 2016, vol. 18, pp. 51-60. doi: 10.1016/2016.05.014

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

PRODUCTIVITY OF *PHAEODACTYLUM TRICORNERUTUM* CULTURE IN NATURAL LIGHT CONDITIONS Chekushkin A.A., Lelekov A.S.

Federal Research Center A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS
Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: chekushkin.78@mail.ru

Abstract. The paper is focused on the growth *Phaeodactylum tricornerutum* batch culture in the natural light conditions. The experiments were carried out in the area of the city of Sevastopol in a horizontal photobioreactor in winter. All external factors (temperature, pH, amount of nutrients in the nutrient medium) were in the optimal range for this species. The only variable value was the influx of solar radiation. In the experiment, changes in the *Ph. tricornerutum* biomass and the influx of solar radiation were determined for nine days. It is shown that the average growth rate was 2.37 g DW m⁻² day⁻¹. The daylight productivity of *Ph. tricornerutum* was about 4-8 g SV/m². The averaged value of the night biomass loss was 18 % of the current culture density, and the losses from the daytime gain reached 100%. A comparison of the obtained average productivity of *Ph. tricornerutum* with the literature data showed that the average value is determined by the influx of solar radiation for given geographical latitude. The daylight productivity and night biomass loss is determined by biochemical composition of *Ph. tricornerutum* culture.

Key words: microalgae, influx of solar radiation, night biomass loss.