

УДК 579.81.083.1

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА КУЛЬТУРЫ *Arthrospira platensis* GOMONT В ДВУХСТУПЕНЧАТОМ ЛЮМИНОСТАТЕ

© 2025 г. Р. Г. Геворгиз<sup>1</sup>, А. С. Лелеков<sup>1,\*</sup>, Н. М. Береговая<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей  
имени А.О. Ковалевского” РАН, Севастополь, 299011 Россия

\*e-mail: a.lelekov@ibss.su

Поступила в редакцию 09.11.2024 г.

После исправления 09.01.2025 г.

Принята к публикации 10.06.2025 г.

Работа посвящена экспериментальному исследованию роста культуры *Arthrospira platensis* в двухступенчатом люминостате. Представлен новый метод проточного культивирования, который позволяет повысить эффективность утилизации энергии излучения, а также управлять содержанием фотосинтетических пигментов в биомассе фотосинтезирующих микроорганизмов. Проведено исследование роста культуры *A. platensis* в первой ступени люминостата в накопительном режиме. Максимальная удельная скорость роста культуры составила 0.96 1/сут, а содержание хлорофилла *a* и С-фикоцианина в биомассе составило – 1.37 и 2.3% соответственно. Определен диапазон колебания доли энергии излучения, проходящей через первую ступень люминостата от 2.23 до 33.24%. Максимальная продуктивность *A. platensis* во второй ступени люминостата составила 0.08 г/(л·сут). При культивировании в режиме двухступенчатого люминостата показано, что во второй ступени из-за снижения облученности происходила адаптация клеток, заключающаяся в незначительном увеличении доли хлорофилла *a* и существенном росте С-фикоцианина – до 13.6%. Рассчитана величина равномерности светового поля ( $\Delta$ ) для каждой ступени люминостата. Для первой ступени  $\Delta$  изменялась от 74 до 43%, для второй ступени  $\Delta$  составила 8%. Полученные результаты позволяют рекомендовать двухступенчатый люминостат для исследования распределения потока излучения в плотных культурах, а также для решения оптимизационных задач по получению биомассы фотосинтезирующих микроорганизмов с заданным пигментным составом.

**Ключевые слова:** накопительная культура, проточная культура, лимитирующие факторы, интенсивность света, продуктивность, эффективность утилизации энергии излучения

**DOI:** 10.7868/S3034574X25060084

В настоящее время в микробиологической практике в управляемых условиях культивирования преимущественно используются два метода получения микробной биомассы: накопительное и непрерывное (проточное) культивирование микроорганизмов. В техническом исполнении накопительное культивирование проще. Однако для направленного управления биосинтезом клеток предпочтение отдается именно проточному культивированию [1]. Важнейшим преимуществом проточного культивирования микроорганизмов является возможность поддержания роста популяции клеток в стационарном динамическом равновесии неограниченное время.

Начиная с первой работы по проточному культивированию Утёнкова [2], основные усилия были направлены на исследование гетеротрофных микроорганизмов [3–11]. В зависимости от параметра стабилизации проточной культуры различают: 1) хемостат – стабилизация по концентрации лимитирующего субстрата [15], 2) плотностат – стабилизация по концентрации клеток [15, 16], 3) рН-стат – стабилизация по величине рН культуральной среды [15], 4) спидостат или рэйтстат – по скорости роста микроорганизмов [15], 5) бистат – стабилизация по концентрации лимитирующего субстрата и рН среды [17] и др. Для управления биосинтезом в проточной культуре также исполь-

зуют многоступенчатые системы культивирования [7, 18], которые позволяют получать целевой продукт заданного химического состава. С практической точки зрения, они позволяют увеличивать эффективность утилизации биогенных элементов, тем самым достигая максимально возможной эффективности технологического процесса.

В отличие от гетеротрофных микроорганизмов обязательным условием для роста низших фототрофов является обеспеченность клеток энергией света [19, 20]. В многочисленных экспериментах было показано, что энергия потока излучения может выступать в роли лимитирующего фактора наравне с биогенными элементами. Следует отметить, что на рост и развитие фотосинтезирующих клеток существенное влияние оказывает не только облученность, но и спектральный состав потока излучения. Поэтому для применения ранее разработанной теории непрерывного культивирования потребовались дополнения и уточнения. Эти обстоятельства накладывают определенные ограничения на конструирование фотобиореакторов для интенсивного культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов с целью повышения КПД фотобиосинтеза.

При интенсивном культивировании низших фототрофов одной из существенных трудностей является обеспечение равномерности облучения клеток. Этого можно добиться только при малой поверхностной концентрации клеток и малой оптической плотности суспензии. Однако для таких разбавленных культур КПД утилизации энергии излучения достаточно низок, поэтому на практике используют оптически плотные культуры, которые практически полностью поглощают фотосинтетически активную радиацию (ФАР). Для равномерности облучения клеток во всех слоях суспензии обычно используют различные способы перемешивания. При интенсивном перемешивании суспензии клеток облученность и спектральный состав потока излучения, поступающего в разные слои суспензии, периодически изменяются: от максимальной, приводящей к фотоингибированию – у освещаемой поверхности фотобиореактора, до минимальной – в глубоких слоях рабочего объема, вплоть до полной темноты. Время, в течение которого облученность клеток изменяется, составляет секунды или доли секунды. Хотя фотосинтетический аппарат клеток адаптируется к изменяющимся условиям окружающей среды, сам процесс адаптации характеризуется значительной инертностью. В зависимости от различных параметров, определяющих скорость фотосинтеза, длительность периода адаптации достигает 6 ч и более [14], что на много больше периода колебания облучения клеток в плотной перемешиваемой культуре. Это приводит к снижению эффективности преобразования энергии потока излучения.

Если в рабочем объеме фотобиореактора пространственно отделить клетки, адаптированные к высокой облученности от клеток, адаптированных к низкой облученности, тогда отдельные слои суспензии будут характеризоваться большими значениями эффективности преобразования энергии ФАР. Это способствует увеличению КПД фотобиосинтеза всего объема фотобиореактора [21]. Кроме того, изменение количества слоев позволит более гибко управлять процессами роста в плотной культуре фотосинтезирующих клеток и получать биомассу заданного биохимического состава. Это открывает новые возможности проточного многоступенчатого культивирования, когда в роли лимитирующего фактора выступает энергия потока излучения (культура в многоступенчатом люминостате).

Описание проточных систем культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов с разделенным рабочим объемом на слои, но объединенных одним протоком питательной среды в литературе не встречаются. Цель настоящей работы – исследование роста и изменения пигментного состава биомассы *A. platensis* в двухступенчатой проточной системе культивирования с разной поверхностной облученностью каждой из ступеней (в двухступенчатом люминостате).

## МЕТОДИКА

Исследования проводили на базе Лаборатории альготехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр “Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН” (ФИЦ ИнБЮМ, Россия). В работе исследовали альгологически чистую культуру цианобактерии *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont (штамм IBSS-31), полученную из коллекций культур микроводорослей и цианобактерий в Центре коллективного пользования “Коллекция гидробионтов Мирового Океана” ФИЦ ИнБЮМ (Россия). Культуру *Arthrospira platensis*, предварительно адаптированную к условиям эксперимента, выращивали в лабораторных условиях на питательной среде Заррук [22] следующего состава (г/л):  $\text{NaHCO}_3$  – 16.8;  $\text{NaNO}_3$  – 2.5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.66;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 1.0;  $\text{NaCl}$  – 1.0;  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  – 0.08;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01;  $\text{CaCl}_2$  – 0.04;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.2;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  –  $2.86 \times 10^{-3}$ ;  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  –  $1.81 \times 10^{-3}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0.222 \times 10^{-3}$ ;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  –  $0.079 \times 10^{-3}$ ;  $\text{MoO}_3$  –  $0.015 \times 10^{-3}$ ;  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  –  $0.02296 \times 10^{-3}$ ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  –  $0.04398 \times 10^{-3}$ ;  $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$  –  $0.0960 \times 10^{-3}$ ;  $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  –  $0.04785 \times 10^{-3}$ ;  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  –  $0.01794 \times 10^{-3}$ ;  $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$  –  $0.0960 \times 10^{-3}$ . Барботаж осу-

шестьюли со скоростью 0.5 л воздуха/л культуры в минуту.

В качестве культиватора использовали плоскопараллельный фотобиореактор, состоящий из двух последовательно расположенных секций относительно направления потока излучения (рис. 1а). Толщина рабочего слоя первой секции составляла 1 см (объем 1 л), а второй – 5 см (объем 5 л). Температуру стабилизировали в оптимальном для *A. platensis* в диапазоне  $34 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Для оценки изменения биомассы ежедневно измеряли оптическую плотность (ОП) на длине волны 750 нм с помощью спектрофотометра Unico-2100 (“United Products and Instruments”, США) (кювета 5 мм). Для пересчета единиц ОП на сухую биомассу использовали линейную зависимость  $B = k \cdot D_{750}$ , г/л, где  $k = 0.85$  – предварительно определенный эмпирический коэффициент [23]. Количественное определение содержания С-фикоцианина проводили по стандартной методике [24]. Хлорофилл *a* рассчитывали по спектру поглощения суспензии клеток методом декомпозиции спектра кривыми Гаусса [25]. Для этого регистрировали спектры поглощения в кюветах 1 см в области полос поглощения С-фикоцианина и хлорофилла *a* в диапазоне от 550 до 750 нм с помощью автоматически регистрирующего двухлучевого спектрофотометра Specord UV-VIS (“Karl Zeis”, Германия). Расчет осуществляли, используя следующее выражение:

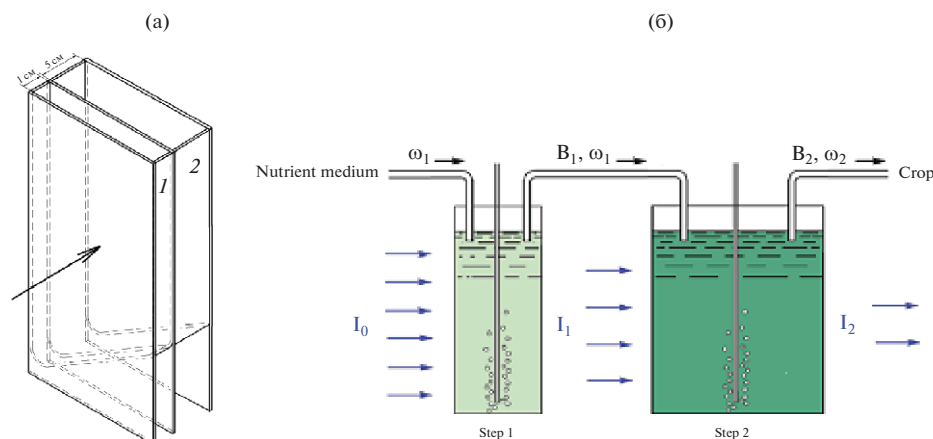
$$D(\lambda) = C_{\text{Хла}} \varepsilon_{\text{Хла}} \left( 0.4e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda-620}{29.5} \right)} + 0.97e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda-678}{13} \right)} \right) + C_{\text{Фико}} \varepsilon_{\text{Фико}} e^{-\ln 2 \left( \frac{\lambda-609}{73.7} \right)}, \quad (1)$$

где  $D(\lambda)$  – оптическая плотность при заданной длине световой волны  $\lambda$ ;  $C_{\text{Хла}}$  – концентрация хлорофилла *a*, г/л;  $C_{\text{Фико}}$  – концентрация С-фикоцианина, г/л;  $\varepsilon_{\text{Хла}}$  – экстинкция хлорофилла *a* – 65 л/(г·см) [25];  $\varepsilon_{\text{Фико}}$  – экстинкция С-фикоцианина – 7.3 л/(г·см) [26].

В качестве источника излучения использовали люминесцентные лампы TDM Electric 18 Вт (Россия). Средняя освещенность рабочей поверхности первой секции фотобиореактора составляла 6 клк (20 Вт/м<sup>2</sup>). Облученность рассчитывали, используя показания люксметра Ю-116 ПО “Вибратор” (Россия), спектр относительной спектральной световой эффективности и спектральные характеристики люминесцентных ламп TDM Electric 18 Вт, предоставленные производителем [27].

Принципиальная схема двухступенчатого люминостата представлена на рис. 1б. На первом этапе, при проведении экспериментов в 1 ступени поддерживали постоянную плотность культуры путем организации квазинепрерывного потока в плотностатном режиме. Для этой цели ежедневно культуру разбавляли свежей питательной средой до заданной величины оптической плотности равной 0.3 ед. ОП. Во 2-й ступени осуществляли накопительное культивирование. После достижения стационарной фазы роста во второй ступени отбирали биомассу из обеих ступеней для измерения концентрации С-фикоцианина.

На втором этапе эксперимента осуществляли проточное культивирование в условиях двухступенчатого люминостата. Для этого и в первой, и во второй ступени проводили квазинепрерывное культивирование следующим образом:



**Рис. 1.** Схема плоскопараллельного фотобиореактора (а), используемого для изучения роста *A. platensis* в двухступенчатом люминостате и его принципиальная схема (б): 1 – первая ступень; 2 – вторая ступень люминостата. Стрелка указывает направление потока излучения;  $I_0, I_1, I_2$  – поверхностная облученность,  $\omega$  – удельная скорость потока,  $B$  – биомасса (см. описание в тексте).

1. Из 2 ступени отбирали определенный объем суспензии согласно заданной удельной скорости протока;

2. Из 1 ступени отбирали такой же объем и переносили его во 2 ступень, тем самым восстанавливая рабочий объем 2 ступени;

3. В 1 ступени рабочий объем восстанавливали свежей питательной средой. Важным отличием условий эксперимента № 2 было то, что проток осуществлялся через обе ступени (секции) фотобиореактора.

Определение концентрации С-фикоцинина и хлорофилла *a* в 1 ступени осуществляли после поддержания культуры в плотностатном режиме в течение недели. Из 2 ступени люминостаа пробы отбирали в момент включения протока и после достижения стационарного динамического равновесия.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

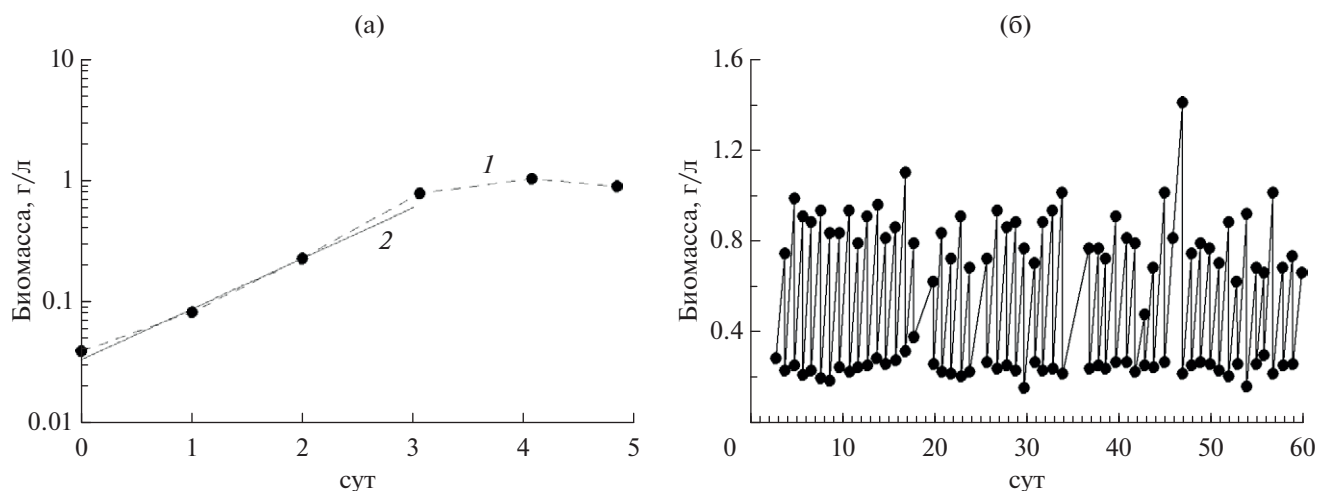
В микробиологической практике для описания проточных систем культивирования используется различная терминология. Если рабочий объем системы культивирования разделен на несколько частей, то все части находятся в различных условиях (по лимитирующему субстрату), так как их объединяет один проток питательной среды, протекающий последовательно через все эти части. В таком случае для каждой части используют следующие термины: секция, стадия, часть каскада, ступень и пр. [6, 27–31]. В настоящей работе использовали термин “ступень” когда все части рабочего объема объединены протоком питательной среды и концентрация лимитирующего субстрата убывала по мере протекания среды от первой ступени до последней. Если части рабочего объема системы культивирования не объединены общим потоком

питательной среды, тогда использовали термин “секция”. Например, в работе [32] исследования проводились в двухсекционном фотобиореакторе, при этом проток питательной среды осуществляли только через первую секцию. То есть, по сути, первая секция выступала в роли своеобразного светового фильтра, спектральные полосы поглощения которого в точности совпадали со спектром поглощения культуры из второй секции. Поскольку обе секции не объединены общим протоком питательной среды, для таких условий культивирования следует использовать термин “двухсекционный фотобиореактор”.

Для многоступенчатой системы культивирования, в которой в качестве стабилизирующего рост параметра выступает энергия потока излучения, проходящая сквозь каждую ступень, будет использоваться термин “многоступенчатый люминостаа”. В настоящей работе в качестве частного случая многоступенчатого люминостаа рассматривается двухступенчатый люминостаа.

Следует отметить, что теория проточного культивирования фотосинтезирующих клеток для многоступенчатого люминостаа не разработана. Но для каждой ступени люминостаа, находящегося в стационарном динамическом равновесии, можно выделить ряд определяющих параметров: поверхностная облученность, рабочий слой (оптический путь или толщина), рабочий объем, плотность культуры, продуктивность культуры, удельная скорость протока для каждой ступени люминостаа, спектральные характеристики культуры в каждой ступени люминостаа, показатель равномерности облучения суспензии клеток.

**Анализ роста культуры в 1 ступени.** На рис. 2а представлена кривая роста *A. platensis* в 1-й ступени люминостаа. Величина удельной скорости роста в экспоненциальной фазе определяется, в пер-



**Рис. 2.** Изменение плотности культуры *A. platensis* в 1 ступени люминостаа: а — кривая роста в полулогарифмических координатах (1), 2 — аппроксимация моделью; б — проточная культура в плотностате.

вую очередь, световыми условиями, которые для низких плотностей культуры неизменны, так как клетки практически не затеяют друг друга. Этот период характеризуется постоянством удельной скорости роста ( $\mu_m = \text{const}$ ), а зависимость плотности культуры от времени имеет вид экспоненциальной кривой:

$$\ln B(t) = \mu_m \cdot (t - t_0) - \ln B_0, \quad (2)$$

где  $B_0$  – плотность культуры в начальный момент времени  $t = 0$ , г/л;  $\mu_m$  – максимальная удельная скорость роста, 1/сут.

Аппроксимация экспериментальных данных выражением (2) показала, что для таких условий культивирования  $B_0 = 0.03$  г/л,  $\mu_m = 0.96$  1/сут (рис. 2а). Таким образом, в рамках экспоненциального роста удельная скорость протока ( $\omega_m$ ) для 1-й ступени люминостата не может превышать 0.96 1/сут. Во избежание вымывания культуры необходимо выполнение условия  $\mu_m \geq \omega_m$ . Величина ослабления светового потока уже на второй день накопительного культивирования по экспериментальным данным достигала  $T_{750} = 54\%$ . Следовательно, для обеспечения условий равномерной облученности клеток необходимо поддерживать плотность проточной культуры в области  $< 0.2$  г/л, при этом коэффициент ежедневного разбавления культуры ( $\theta$ ) определяется по формуле [33]:

$$\theta = \frac{B_k}{B_k^{st}} = \frac{B_k}{B_{k-1}^{st}} = \frac{V}{V - w}, \quad (3)$$

где  $B_k$  – плотность культуры до разбавления, г/л;  $k$  – порядковый номер разбавления;  $B_k^{st}$  – плотность культуры после разбавления (стационарная плотность), которая равна плотности после разбавления на предыдущем шаге  $B_{k-1}^{st}$ , г/л,  $V$  – объем суспензии клеток в 1 ступени люминостата, л;  $w$  – объем суспензии удаляемый из 1 ступени люминостата при квазинепрерывном культивировании, л.

Подставляя экспериментальные данные в выражение (3), получим:

$$\frac{B_k}{B_{k-1}^{st}} = \frac{0.2 \cdot \exp(0.96 \cdot 1)}{0.2} = \frac{1}{1 - w},$$

откуда видно, что для поддержания плотностатного режима культивирования в 1-й ступени необходимо ежедневно удалять  $w = 0.62$  л суспензии.

На рис. 2б представлены экспериментальные данные роста культуры *A. platensis* в режиме плотностата для 1-й ступени. По данным эксперимента среднее значение сливаемого объема из 1-й ступени составило  $w = 0.677$  л. Экспериментальные значения удельной скорости протока превышают расчетные на 0.057 1/сут, что можно объяснить процессами автоселекции в условиях плотностата.

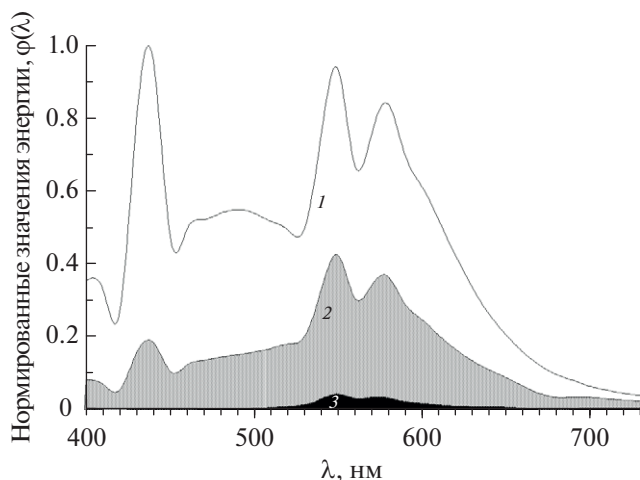
Из рис. 2б видно, что биомасса колебалась в широких пределах: в среднем от 0.25 до 0.79 г/л. Учитывая то, что произведение энергетического спектра источника излучения  $\phi(\lambda)$  и спектра ослабления культуры  $T(\lambda)$  в 1-й ступени, определяет долю потока излучения, проходящего сквозь 1-ю ступень, можно оценить колебания поверхностной облученности 2-й ступени люминостата в области ФАР по формуле:

$$\delta_{\text{ФАР}} = \frac{\int_{380}^{720} \phi(\lambda) \cdot T(\lambda) d\lambda}{\int_{380}^{720} \phi(\lambda) d\lambda}, \quad (4)$$

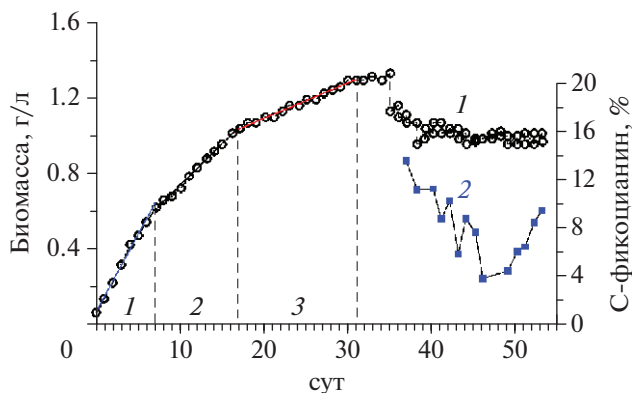
где  $\delta_{\text{ФАР}}$  – доля энергии ФАР, проходящая сквозь 1-ю ступень люминостата.

В эксперименте поверхностная облученность 1-й ступени составляла 20 Вт/м<sup>2</sup>. Расчет по формуле (4) показал, что до и после процедуры обмена питательной среды при плотности культуры равной 0.79 и 0.2 г/л доля энергии, проходящей сквозь 1-ю ступень, составляла 2.23 и 33.24% соответственно. Следовательно, поверхностная облученность 2-й ступени колебалась от 0.45 до 6.65 Вт/м<sup>2</sup>. Изменение спектральных характеристик потока излучения для обеих ступеней люминостата представлено на рис. 3. Анализируя полученные данные, можно видеть, что облученность 2-й ступени в 3–45 раза ниже суммарной энергии, падающей на поверхность 1-й ступени. Также, важно отметить, что большая часть энергии потока излучения, попадающего на 2-ю ступень, приходится на зеленую и желтую часть спектра, что приводит к накоплению фотосинтетических пигментов [34, 35].

**Анализ роста культуры во 2-й ступени.** На рис. 4 представлена накопительная кривая роста культуры *A. platensis* во 2-й ступени люминостата. Из-за лимитирования роста энергией излучения экспоненциальная фаза во 2-й ступени отсутствовала. Накопительная кривая характеризовалась продолжительной фазой замедления роста, на которой наблюдались “изломы”, каждый из линейных участков характеризовался постоянством скорости роста (продуктивности) биомассы. Для интервала времени от 0 до 7 суток  $P_1 = 0.08$  г/(л·сут). Для интервала от 7 до 17 сут значение продуктивности уменьшилось вдвое  $P_2 = 0.04$  г/(л·сут). Наименьшее значение скорости роста наблюдалось для интервала времени от 17 до 31 сут –  $P_3 = 0.02$  г/(л·сут). Наличие точек “излома” накопительной кривой указывало на смену лимитирующего фактора [36]. Возможно, это обусловлено увеличением рН культуральной среды, в результате чего при переходе  $\text{HCO}_3^-$  в  $\text{CO}_3^{2-}$  поток углерода и скорость его ассимиляции уменьшается [37]. Причины, приводящие к “изломам” накопительной кривой культуры низших фотоавтотрофов по-прежнему неизвестны. Этот вопрос заслуживает отдельного внимания,



**Рис. 3.** Энергетический спектр  $\varphi(\lambda)$  лампы TDM Electric 18 Вт: 1 – спектр лампы; 2 – спектр света после прохождения сквозь 1 ступень при плотности культуры 0.2 г/л; 3 – спектр света после прохождения сквозь 1 ступень при плотности культуры 0.79 г/л.



**Рис. 4.** Изменение плотности культуры *A. platensis* и концентрации С-фикоцианина во 2 ступени люминесцента. Цифры указывают линейные участки накопительной кривой: 1 –  $V_{21}(t) = 0.08 \cdot t + 0.07$ ; 2 –  $V_{22}(t) = 0.04 \cdot t + 0.3$ ; 3 –  $V_{23}(t) = 0.02 \cdot t + 0.7$ . С 35 сут – проточный режим двухступенчатого люминесцента (1); 2 – динамика содержания С-фикоцианина.

поэтому необходимы дальнейшие исследования физиологических механизмов субстратзависимого роста.

Подчеркнем, что во 2-й ступени люминесцента накопительная кривая характеризовалась тремя точками “излома”, т.е. лимитирующий фактор по мере увеличения плотности культуры менялся трижды. Следовательно, в условиях эксперимента для оптимизации многоступенчатого люминесцента, 2-я ступень должна быть разделена минимум на 4 ступени.

Начиная с 37 дня эксперимента, ежедневно осуществляли проток во 2-й ступени. Поскольку

теория проточной культуры в многоступенчатом люминесценте на сегодняшний день не разработана, величину удельной скорости протока подбирали эмпирически, опираясь на следующие ограничения: 1) объем суспензии клеток, поступающий из 1-й ступени, не превышал 0.677 л; 2) удельная скорость протока во 2-й ступени должна быть в диапазоне 0.1–0.15 1/сут. 3. Энергия излучения, прошедшая сквозь 1-ю ступень, должна полностью поглощаться клетками 2-й ступени, то есть, учитывая выражение (4), рабочий слой должен быть не менее 5 см. С учетом этих ограничений в нашем эксперименте использовали 2-ю ступень с рабочим слоем 5 см и рабочим объемом 5 л.

На 46 день эксперимента во 2-й ступени люминесцента наблюдалось стационарное динамическое равновесие, плотность культуры стабилизировалась на уровне 1 г/л. При таких условиях протока производительность двухступенчатого люминесцента составила 0.11 г/(л·сут).

**Спектральные характеристики культуры *A. platensis*.** На рис. 5 представлены спектральные характеристики культуры из 1-й и 2-й ступеней люминесцента. Очевидно, что в 1-й ступени максимум С-фикоцианина в области 620 нм ниже, чем максимум хлорофилла *a* при 678 нм. Обратная картина наблюдалась для 2-й ступени. Соотношение полос поглощения для 1-й ступени составило  $\Delta D_{620}/\Delta D_{680} = 0.9$ , в то время как для 2-й – 1.1. Поскольку культура *A. platensis* в 1-й ступени находилась в нелимитированных световых условиях, содержание С-фикоцианина в клетках было невелико и составляло 2.3% от сухого вещества. Также наблюдалось достаточно низкое содержание хлорофилла *a* – 1.37% сухой биомассы. Во 2-й ступени, напротив, из-за низкой облученности наблюдались достаточно высокое содержание обоих пигментов.

Наибольшая концентрация С-фикоцианина 13.6% была в первые дни проточного культивирования (рис. 4). В протоке при снижении плотности культуры и увеличении облученности биомассы во 2-й ступени наблюдалось заметное снижение концентрации С-фикоцианина. Наименьшее значение было достигнуто в момент стабилизации плотности культуры (стационарное динамическое равновесие), после чего скорость синтеза С-фикоцианина снова увеличивалась, при этом содержание достигло 10%. Такая нелинейная динамика пигментов отмечалась нами ранее при переносе клеток микроводорослей с низкой освещенности на высокую, когда наблюдалось явление “ложного старта” [38]. Содержание хлорофилла *a* в биомассе в стационарном динамическом равновесии 2-й ступени не сильно варьировало и составляло 1.45%.

Одной из важнейших оптических характеристик роста культуры микроводорослей является показатель равномерности облучения  $\Delta$ , который

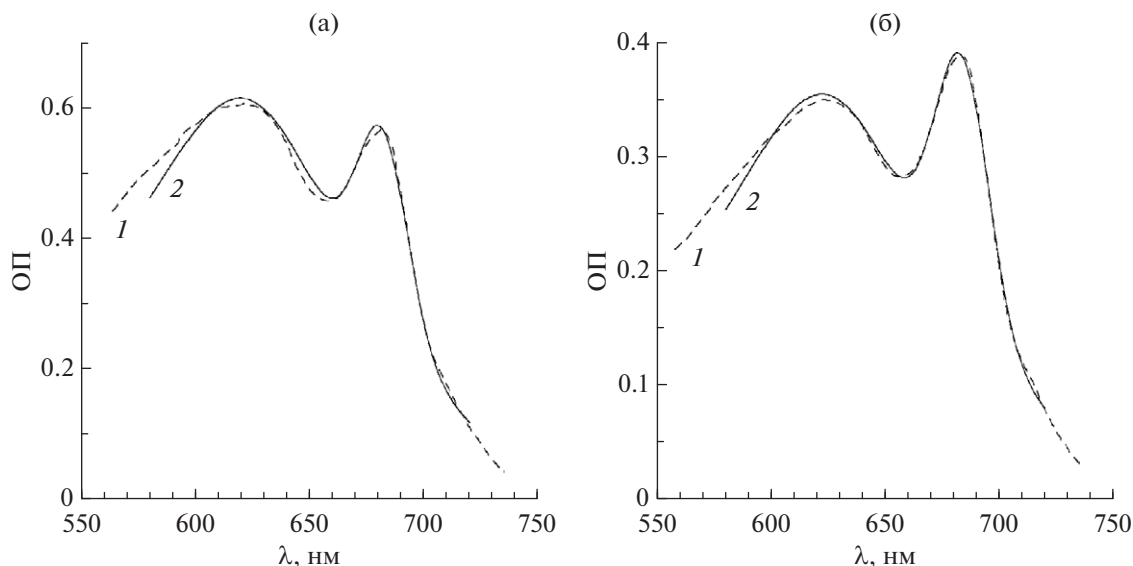


Рис. 5. Спектры поглощения (2) культуры *A. platensis*: а – в 1, б – во 2 ступенях люминесценции: 1 – аппроксимация моделью.

отражает однородность светового потока, воздействующего на клетки микроводорослей [39]:

$$\Delta = \frac{\bar{I}}{I_0} = \frac{\frac{1}{L} \int_{380}^{720} \int_0^L I(l, \lambda) dl d\lambda}{I_0} = \frac{1 - 10^{-D_{\text{ФАР}}}}{2.3 \cdot D_{\text{ФАР}}},$$

где  $\bar{I}$  – средняя облученность клеток при одностороннем освещении, Вт/м<sup>2</sup>;  $I_0$  – поверхностная облученность культуры, Вт/м<sup>2</sup>;  $I(l, \lambda)$  – облученность элементарного слоя, Вт/м<sup>2</sup>;  $L$  – оптический слой, м;  $D_{\text{ФАР}}$  – интегральная оптическая плотность культуры в области ФАР, ед. ОП.

Расчеты показали, что в стационарном состоянии в 1-й ступени величина  $\Delta$  изменялась от 74 до 43%. Во 2-й ступени равномерность облучения составляла 8% и практически не изменялась ввиду небольшой разницы между значениями биомассы до и после обмена. Результаты расчетов свидетельствуют о том, что во второй ступени наблюдалась неоднородность потока излучения ФАР. Это обусловлено не только снижением потока за счет поглощения в первой ступени, но и изменением спектрального состава облучения. Тем не менее, это позволяет культуре адаптироваться к таким условиям за счет увеличения содержания С-фикоцианина.

\*\*\*

В данной работе впервые апробирована идея пространственного разделения адаптированных к различной облученности фотосинтезирующих клеток в плотной культуре микроводорослей с целью повышения утилизации энергии потока

излучения посредством увеличения содержания фотосинтетических пигментов на единицу биомассы. Экспериментально доказано, что путем изменения условий культивирования посредством варьирования скорости протока в многоступенчатом люминестате можно управлять пигментным составом культуры. Так в первой ступени клетки, находящиеся при оптимальных световых условиях, характеризовались низким содержанием хлорофилла *a* и С-фикоцианина – 1.37 и 2.3% соответственно. При переносе клеток из первой ступени во вторую содержание хлорофилла практически не изменялось, а С-фикоцианина – носило сложный нелинейный характер. Максимальное значение содержания данного пигмента во второй ступени достигло 13.6%, что почти в 6 раз выше, чем в первой ступени.

Ввиду отсутствия полноценной теории роста фотосинтезирующих микроорганизмов остаются невыясненными многие вопросы. А именно, вопросы влияния таких параметров как: удельная скорость протока и величина поверхностной облученности, число ступеней люминестата и длины оптического пути для каждой из них, на продуктивность и биохимический состав клеток.

Настоящая работа, по сути, обобщает все известные способы проточного культивирования микроорганизмов и является первым шагом в разработке теории многоступенчатого люминестата, что позволит расширить понимание о распределении светового поля внутри суспензии пигментированных клеток, а также увеличить эффективность процессов культивирования с целью получения урожая с высоким содержанием ценных веществ.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме “Комплексное исследование механизмов функционирования биотехнологических комплексов с целью получения активных веществ из гидробионтов” (№ гос. регистрации 124022400152-1), при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 25-79-30002).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Работнова И.А., Позмогова И.Н.* Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов. М.: “Наука”, 1979. 207 с.
2. Патент СССР. 1929. № 9750.  
<https://patentdb.ru/patent/9750>
3. *Novick A., Szilard L.* // *Science*. 1950. V. 112. P. 715–718.  
<https://doi.org/10.1126/science.112.2920.715>
4. *Herbert D., Elsworth R., Telling R.C.* // *J. Gen. Microb.* 1956. V. 14. № 3. P. 601–622.  
<https://doi.org/10.1099/00221287-14-3-601>
5. *Maxon W.D.* // *Appl. Microb.* 1955. V. 3. № 2. P. 110–122.  
<https://doi.org/10.1128/am.3.2.110-122.1955>
6. *Methods in Microbiology* / Eds J.R. Norris, D.W. Ribbons. London, New York: Academic Press, 1970. 445 p.  
[https://doi.org/10.1016/S05809517\(08\)70210-1](https://doi.org/10.1016/S05809517(08)70210-1)
7. *Перт С.Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток. Перевод с англ. / Ред. И.Л. Работновой. М.: Мир, 1978. 330 с.
8. *Harmand J., Lobry C., Rapaport A., Sari T.* The Chemostat. Mathematical Theory of Microorganism Cultures. London: Wiley, 2017. V. 1. 230 p.
9. *Microalgae Biotechnology* / Eds. Posten P., Chen S.F. Switzerland, Springer, 2016. 188 p.
10. *Smith H.L., Waltman P.* The Theory of the Chemostat: Dynamics of Microbial Competition. Cambridge University Press, 1995. 330 p.
11. *Stanbury P.F., Whitaker A., Hall S.J.* Principles of Fermentation Technology (Third Ed.), Chap. 2. Microbial growth kinetics, Butterworth-Heinemann, 2017. P. 21–74.
12. *Утенков М.Д.* Микрогенерирование. М.: Советская наука, 1941. 152 с.
13. *Myers J., Clark L.B.* // *J. Gen. Physiol.* 1944. V. 28. P. 103–112.  
<https://doi.org/10.1085/JGP.28.2.103>
14. *Bryson V., Szybalski W.* // *Science*. 1952. V. 116. № 3003. P. 45–51.  
<https://doi.org/10.1126/science.116.3003.45>
15. *Печуркин Н.С.* Популяционная микробиология. Новосибирск: Наука, 1978. С. 1–278.
16. *Гуревич Ю.Л., Ковров Б.Г.* // *ДАН СССР*. 1967. Т. 174. № 1. С. 213–214.
17. *Минкевич И.Г.* Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. М.: Регулярная и хаотическая динамика; Институт компьютерных исследований, 2005. 351 с.
18. *Clement T., Perez M., Mouret J.R., SabJayrolles J.M., Camarasa C.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 150. № 1. P. 42–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.016>
19. *Bougaran G., Bernard O., Sciandra A.* // *J. Theor. Biol.* 2010. V. 265. № 3. P. 443–454.
20. *Martínez C., Bernard O., Mairet F.* // *IFAC PapersOn-Line*. 2018. V. 51–52. P. 735–740.
21. *Сидько Ф.Я., Терсков И.А., Береснев Г.Ф., Ерошин Н.С., Захарова В.А.* // *ДАН СССР*. 1971. Т. 199. № 5. С. 1206–1208.
22. *Andrade B.B., Cardoso L.G., Assis D.J., Costa J.A.V., Druzian J.I., da Cunha Lima S.T.* // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 284. P. 340–348.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.144>
23. *Геворгиз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г.* // *Экология моря*. 2005. Т. 70. С. 96–106.  
<https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4711>
24. *Геворгиз Р.Г., Нехорошев М.В.* Количественное определение массовой доли С–фикоцианина и аллофикоцианина в сухой биомассе *Spirulina (Arthrospira) platensis* North. Geitl. Холодная экстракция. Севастополь: Институт морских биологических исследований, 2017. 21 с.
25. *Лелеков А.С., Чернышев Д.Н., Ключкова В.С.* // *Математическая биология и биоинформатика*. 2022. Т. 17. № 1. С. 156–170.  
<https://doi.org/10.17537/2022.17.156>
26. *Стадничук И.Н.* Фикобилипротеины. Биологическая химия. М.: ВИНТИ, 1990. Т. 40. 196 с.
27. *Геворгиз Р.Г., Малахов А.С.* Пересчет величины освещенности фотобиореактора в величину облученности. Севастополь: ООО “Колорит”, 2018. 60 с.  
<https://repository.marine-research.ru/handle/299011/2068>
28. *Fencl Z., Rcica J., Kodesova J.* // *J. Appl. Chem. Biotechnol.* 1972. V. 22. P. 405–416.
29. *Силкин В.А., Белянин В.Н., Паутова Л.А.* // *Биология моря*. 1977. Т. 1. С. 73–77.
30. *Young B.M., Antczak L.M., Shankar K., Heise R.L.* // *Cel. Tis. Organs*. 2021. V. 210. № 4. P. 301–310.  
<https://doi.org/10.1159/000517622>
31. *Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Малахов А.С.* // *Морской биологический журнал*. 2023. Т. 8. № 1. С. 27–50.  
<https://doi.org/10.21072/mbj.2023.08.1.03>
32. *Шабанова А.В., Лелеков А.С.* // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2017. Т. 2. № 1. С. 114–117.

33. Тренкешу Р.П. // Экология моря. 2005. Т. 67. С. 98–110.  
<https://repository.marine-research.ru/handle/299011/4659>
34. Козел Н.В., Доманский В.П., Мананкина Е.Е., Адамчик К.О., Дремук И.А., Савина С.М. // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. 2015. № 2. С. 44–49.
35. Wu H. // Biomed. Res. Int. 2016.  
<https://doi.org/10.1155/2016/7383918>
36. Тренкешу Р.П. // Вопросы современной альгологии. 2017. № 2 (14).  
<http://algology.ru/1180/>
37. Геворгиз Р.Г., Лелеков А.С. // Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2021. Т. 6. № 4. С. 576–579.
38. Тренкешу Р.П., Лелеков А.С. // Морской экол. журн. 2011. Вып. 10. № 1. С. 73–76.  
<https://repository.marine-research.ru/handle/299011/1140>
39. Белянин В.Н., Сидько Ф.Я., Тренкешу А.П. Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей. Новосибирск: Наука, 1980. 136 с.

## Growth Study *Arthrospira platensis* Gomont Culture in a Two-Stage Luminostat

R. G. Gevorgiz<sup>a</sup>, A. S. Lelekov<sup>a,\*</sup>, N. M. Beregovaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of Russian Academy of Sciences, Sevastopol, 299011 Russia*

\**e-mail: a.lelekov@ibss-ras.ru*

The work is devoted to the experimental study of *Arthrospira platensis* culture growth in a two-stage luminostat. A new method of flow culture is presented, which allows to increase the efficiency of light energy assimilation, as well as to control the content of photosynthetic pigments in algal biomass. In the first stage, the growth of *A. platensis* culture in the first stage of luminostat in batch mode was investigated. Due to high surface and spatial irradiance, a prolonged exponential phase is present on the growth curve. The maximum specific growth rate of the culture was 0.96 1/day and the chlorophyll *a* and C-phycoyanin content was low – 1.37 and 2.3% respectively. The light energy passing through the first stage varied from 2.23 to 33.24% depending on the maintained density of the quasi-continuous culture. The reduction in light flux affected the maximum productivity of *A. platensis* in the second stage of luminostat, which was 0.08 g/(l·day). In the second experiment, cultivation was carried out in a two-stage luminostat regime, in which the nutrient medium was sequentially flowed through both stages. It was shown that in the second stage, due to a decrease in irradiance, photoadaptation of *A. platensis* cells occurred, consisting in a slight increase in the proportion of chlorophyll *a* and a significant increase in C-phycoyanin – 13.6 %. The pigment content was directly influenced by the uniformity of cell irradiation, which for the second stage was only 8 %, which led to a decrease in productivity and an increase in the content of C-phycoyanin. The obtained results allow us to recommend the two-stage luminostat for optimisation problems solving on obtaining microalgae biomass of a given pigment composition.

**Keywords:** batch culture, continuous culture, limiting factors, light intensity, productivity, light assimilation efficiency